

## **Remarks/Arguments**

Applicant voluntarily cancels the claims previously pending in this application, and introduces new claims 61-119 as a voluntary amendment to the claims in this application.

In the Action, the Examiner states that the previously pending claims lacked unity of invention because they are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. Applicant notes for the record that Applicant does not agree with the Examiner's statement. The previously pending claims were linked for instance in that the claims all contained a fatty acyl moiety (XYZ) containing a substituent Y; the fatty acids were not beta-oxidizable. The claims did form a general inventive concept under PCT Rule 13.1. Applicant has voluntarily cancelled all of these claims in the present response.

New claims 61-97 are directed to lipid compounds according to the present invention, and new claims 98-119 are directed largely to compositions including these compounds and methods for using these compounds.

The Examiner states in paragraph 4 (page 10) of the Action, regarding the previously pending claims, that the substituents on the core structure render the ensuing structures to invariably exhibit different chemical properties. While the Examiner did not have new claims 61 et al to consider when making this statement, Applicant submits that the compounds of the new claims are linked so as to form a general inventive concept. For instance, all of the lipid compounds of claims 61-97 contain a modified fatty acid incorporated in the lipid, where the modification has at least one Y substituent, for instance a sulfur. These modified fatty acids are non-beta-oxidizable fatty acids. Without being bound to theory, it is believed that these modified fatty acids are hydrolyzed from the lipid compound *in vivo* and are responsible for biological effects obtained *in vivo*.

At least for the foregoing reasons, Applicant submits that the claimed structures share at least this common technical feature and do not have invariably different chemical properties. The claims have unity of invention under PCT Rule 13.1.

Similarly, with reference to the Examiner's comments regarding the unity of pharmaceutical compositions of this invention, the pharmaceutical compositions have similar features and have unity of invention.

### **Group A – lipid compound**

In the Action, the Examiner requires the election of one of nine species of lipid compound identified by the Examiner. While as discussed above Applicant submits that all of the pending claims share a common general inventive concept, and while the new claims are different from the previously pending claims, and may not be subject to the requirements of the present Action, to fully comply with and respond to the Examiner's requirement, to the extent that such an election may apply to the new claims, Applicant

elects species 2, "compound of [previously pending] claim 5 and 7, respectively". Those new claims readable thereon appear to be as follows:

On previously pending claim 5, new claims 61-97

On previously pending claim 7, new claims 61-62, 68, 71-82, 86-97

Applicant contacted the Examiner by telephone on April 2, 2007 to clarify requirements for responding to the present Action. Applicant thanks the Examiner for her clarifying remarks. During the telephone conversation, the Examiner further requested that Applicant identify subspecies of X, Y and Z with the present election of a lipid compound. Applicant submits that for instance new claim 61 and the other new claims herein include subspecies of X, Y and Z that are narrower than the previous claims, and believes the present claims satisfy the Examiner's request.

#### Group B – pharmaceutical composition

In the Action, the Examiner requires the election of one of five species of pharmaceutical composition identified by the Examiner. To fully comply with the Examiner's requirement, to the extent that such an election may apply to the new claims, Applicant elects species 1, relating to previously pending claim 40. The pending claim readable thereon appears to be new claim 101.

#### Group C - method

In the Action, the Examiner requires the election of one of twelve species of method identified by the Examiner. To fully comply with the Examiner's requirement, to the extent that such an election may apply to the new claims, Applicant elects species 1, relating to previously pending claim 45. The pending claim readable thereon appears to be new claim 102.

In the Action, the Examiner also requires the identification of a single disclosed disease related to the above elected method. In response, Applicant elects an overweight condition including obesity. Applicant further submits that the diseases listed in new claim 102 form a common inventive concept as they are all related to the homeostasis of lipids and/or carbohydrates, for instance by the beta oxidation of fatty acids or via the peroxisome proliferators activating receptor.

#### Information Disclosure Statement

In the Action, the Examiner states that the Information Disclosure Statement (IDS) submitted on August 28, 2006 fails to comply with U.S. patent practice, and that the IDS has been placed in the application file but the information referred to therein has not been considered on its merits. In response, Applicant respectfully submits that the IDS referred to by the Examiner was submitted to the U.S. PTO on August 25, 2006, and that the IDS is compliant with U.S. patent practice.

The Examiner states that the IDS is non-compliant in part because Foreign Patents EP0250994 and PCT3014073 are in non-English format. Applicant respectfully directs

the Examiner to page 2 of the letter accompanying the IDS, wherein Applicant expressly notes that a copy of the International Search Report (ISR) is included with the IDS, and that such Report satisfies the requirement for a translation or concise explanation of any non-English reference cited therein, as provided in MPEP 609(A)(3). Applicant notes the correct MPEP reference here is 609.04(a)(III). Both of the Foreign Patents discussed above are listed and categorized in the ISR: PCT3014073 is the first document listed therein, and EP0250994 is listed in the first entry at the top of the second page of the document listing of the ISR. Applicant submits that the foreign documents were provided as required under US patent practice therefore, and requests that the Examiner withdraw this objection to the IDS. As a courtesy, Applicant includes a copy of each document with this response, with a fresh copy of the ISR. Also, Applicant's representative has identified U.S. published applications or patents that may be counterparts to each of these Foreign Patents: U.S. Patent No. 5,399,353 may be a counterpart of EP0250994 and U.S. Patent Publication No. 2004/0192908 A1 may be a counterpart of PCT3014073. While Applicant has not prepared the English versions of these possible counterparts, and does not represent that such are accurate English language translations of the cited documents, Applicant's representative encloses a copy of each herein for the Examiner's convenience.

The Examiner also states that the IDS is non-compliant in part because Foreign Patent EP0447553 and Other Documents Horiike et al., Bestmann et al., Bartnik et al. and Kurri, Jun et al. pertain to subject matters irrelevant to the instant application. In response, Applicant notes that EP0447553, Kurri, Jun et al., and Bartnik et al. are all listed in the ISR as documents relevant to the present application, and presented in good faith as disclosed in a foreign search report, in compliance with the duty to disclose information to the U.S. PTO. Also, Horiike et al. is listed as reference number 7 at the end of the present application, and Bestmann et al. is listed as reference number 12 at the end of the present application. Applicant supplied these documents in good faith to the Examiner, as documents cited by a foreign patent office or mentioned in the present application, and respectfully requests that the Examiner withdraw the present rejection to this IDS as non-compliant.

Applicant also requests that the Examiner consider all of the documents provided with the IDS filed August 25, 2006, in keeping with U.S. practice.

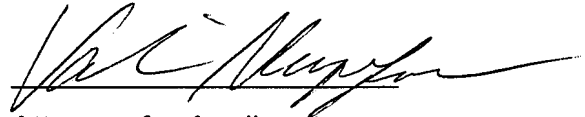
In the event that the Examiner maintains any concerns regarding the IDS, as filed or as clarified in the present response, the Examiner is invited to contact the undersigned representative to discuss this matter by telephone, so that the Applicant may work to further resolve any such concerns.

At least in view of the foregoing comments, Applicant submits all of the issues raised in the pending Office Action have been addressed and, where appropriate, overcome.

Respectfully submitted,

April 6, 2007

Date



Attorney for Applicant  
Valerie Neymeyer-Tynkov  
c/o Ladas & Parry LLP  
224 South Michigan Avenue  
Chicago, Illinois 60604  
(312) 427-1300

Reg. No. 46956

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/GB 03/02582

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07F9/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, PAJ, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO 03 014073 A (GENFIT, FR.) 20 February 2003 (2003-02-20) abstract; figure 1A ---	1-56
X	DATABASE CA 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; KURII, JUN ET AL: "Bleaching composition" retrieved from STN Database accession no. 115:73992 XP002252447 see RN 135261-33-5 abstract & EP 0 447 553 A (KAO CORP., JAPAN) 25 September 1991 (1991-09-25) --- -/--	1-3,5,7, 8,12-14, 18, 21-25, 28,29,36

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

1 September 2003

Date of mailing of the International search report

12/09/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Zellner, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte.      pplication No

PCT/GB 03/02582

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE CA 'Online!  CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,  OHIO, US;  BARTNIK, FRIEDHELM ET AL: "Film-forming,  resorbable wound dressing containing  oligomeric esters of lactic acid or  glycolic acid"  retrieved from STN  Database accession no. 110:160369  XP002252448  see RN 119797-92-1, RN 119797-93-2, RN  119797-94-3, RN 119797-95-4  abstract  &amp; EP 0 250 994 A (HENKEL K.-G.A.A., FED.  REP. GER.) 7 January 1988 (1988-01-07)</p>	<p>1-3,5,7,  8,12,13,  21-25,  28,29,36</p>
X	<p>DATABASE CA 'Online!  CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS,  OHIO, US;  MOLLEYRES, LOUIS P. ET AL: "Structural  studies on the diglyceride-mediated  activation of protein kinase C"  retrieved from STN  Database accession no. 110:20347  XP002252449  see RN 117933-45-6, RN 117933-46-7, RN  119747-21-4  abstract  &amp; JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1988),  263(29), 14832-8,</p>	<p>1-3,5,7,  8,12,13,  21-25,  29,36</p>
A	<p>WO 01 68582 A (SYDNES LEIV K ;BERGE ROLF  (NO); SONGSTAD JON (NO); THIA MEDICA AS)  20 September 2001 (2001-09-20)  cited in the application  the whole document</p>	<p>1-56</p>
A	<p>EP 0 345 038 A (NORSK HYDRO AS)  6 December 1989 (1989-12-06)  cited in the application  the whole document</p>	<p>1-56</p>
A	<p>WO 99 58120 A (BERGE ROLF)  18 November 1999 (1999-11-18)  the whole document</p>	<p>1-56</p>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB 03/02582

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 47, 48, 50, 54 and 55 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out (in part) and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☒ Claims Nos.: 1-56  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-56

The present claims relate to an extremely large number of possible compounds/products/methods. In fact, the claims contain so many options and variables that a lack of clarity (and/or conciseness) within the meaning of Article 6 PCT arises to such an extent as to render a meaningful search of the claims impossible. Furthermore, the application as a whole does not appear to contain sufficient support within the meaning of Art. 5 PCT since only a very small portion of the claimed compounds is considered sufficiently disclosed in order to provide information about the biological activity to the skilled person.

Consequently, the search has been carried out for those parts of the application which do appear to be clear (and/or concise), namely those compounds wherein Y is selected from S, Se, O; Z = CH<sub>2</sub>; PHG = PC, PE or glycerol as well as the examples given in the description.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int. application No  
 PCT/GB 03/02582

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03014073 3 A		NONE	
EP 0447553 A	25-09-1991	JP 1981427 C	25-10-1995
		JP 4007399 A	10-01-1992
		JP 7005914 B	25-01-1995
		JP 2756012 B2	25-05-1998
		JP 3220298 A	27-09-1991
		JP 2608335 B2	07-05-1997
		JP 3121200 A	23-05-1991
		JP 2597725 B2	09-04-1997
		JP 3097798 A	23-04-1991
		DE 69027423 D1	18-07-1996
		DE 69027423 T2	06-02-1997
		EP 0447553 A1	25-09-1991
		HK 44497 A	18-04-1997
		US 5545349 A	13-08-1996
		WO 9103542 A1	21-03-1991
		SG 43007 A1	17-10-1997
EP 0250994 A	07-01-1988	DE 3620685 A1	23-12-1987
		AT 78406 T	15-08-1992
		DE 3780525 D1	27-08-1992
		EP 0250994 A2	07-01-1988
		ES 2053469 T3	01-08-1994
		JP 63003865 A	08-01-1988
		US 5399353 A	21-03-1995
WO 0168582 A	20-09-2001	NO 20001123 A	04-09-2001
		AU 3783501 A	24-09-2001
		BR 0108950 A	28-01-2003
		CA 2401757 A1	20-09-2001
		CN 1419532 T	21-05-2003
		EP 1265838 A1	18-12-2002
		WO 0168582 A1	20-09-2001
		NO 20024114 A	30-10-2002
EP 0345038 A	06-12-1989	AT 96664 T	15-11-1993
		CA 1329550 C	17-05-1994
		DE 68910386 D1	09-12-1993
		DE 68910386 T2	09-06-1994
		DK 267689 A	03-12-1989
		EP 0345038 A2	06-12-1989
		ES 2059749 T3	16-11-1994
		US 5093365 A	03-03-1992
WO 9958120 A	18-11-1999	WO 9958120 A1	18-11-1999
		AT 245416 T	15-08-2003
		AU 762792 B2	03-07-2003
		AU 4936699 A	29-11-1999
		AU 762790 B2	03-07-2003
		AU 4936799 A	29-11-1999
		AU 761355 B2	05-06-2003
		AU 5451799 A	29-11-1999
		AU 7240398 A	29-11-1999
		BR 9910296 A	15-01-2002
		CA 2331393 A1	18-11-1999
		CA 2331395 A1	18-11-1999
		CA 2331408 A1	18-11-1999

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte  
Application No  
PCT/GB 03/02582

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9958120 A		CN 1302204 T	04-07-2001
		CN 1300211 T	20-06-2001
		CN 1300212 T	20-06-2001
		DE 69909775 D1	28-08-2003
		EP 1284139 A1	19-02-2003
		EP 1285652 A1	26-02-2003
		EP 1075258 A1	14-02-2001
		EP 1075259 A1	14-02-2001
		EP 1075260 A2	14-02-2001
		JP 2002514594 T	21-05-2002
		JP 2002514595 T	21-05-2002
		JP 2002514596 T	21-05-2002
		WO 9958121 A1	18-11-1999
		WO 9958122 A1	18-11-1999
		WO 9958123 A2	18-11-1999
		NO 20005461 A	08-01-2001
		NO 20005462 A	08-01-2001
		NO 20005463 A	08-01-2001
		NZ 508047 A	30-05-2003
		US 2002198259 A1	26-12-2002
		US 6417232 B1	09-07-2002
		US 6441036 B1	27-08-2002
		US 6365628 B1	02-04-2002

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
20 février 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 03/014073 A1

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07C 323/52, A61K 31/22, 31/23

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR02/02831

(22) Date de dépôt international : 8 août 2002 (08.08.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
01 10645 9 août 2001 (09.08.2001) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : GENFIT  
[FR/FR]; Parc Eurasanté, Lille Métropole, 885, Av. Eugène  
Avinée, F-59120 Loos (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : NA-  
JIB-FRUCHART, Jamila [FR/FR]; 185, rue Clémenceau,  
F-59211 Santes (FR). CAUMONT-BERTRAND, Karine  
[FR/FR]; 1 rue Olivier de Serres, F-59930 La Chapelle  
d'Armentières (FR).

(74) Mandataires : BECKER, Philippe etc.; Cabinet Becker  
et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,  
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), brevet  
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont  
reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: FATTY ACID COMPOUNDS, PREPARATION AND USES THEREOF

(54) Titre : COMPOSES DERIVES D'ACIDES GRAS PREPARATION ET UTILISATIONS

(57) Abstract: The invention concerns novel molecules, their preparation and their uses, in particular in the field of human and veterinary medicine and in cosmetics. The inventive compounds are partly fatty acid derivatives and exhibit advantageous pharmacological and cosmetic properties. The invention also concerns various uses of said compounds, the pharmaceutical compositions containing them and methods for preparing them. The inventive compounds are useful in particular for preventing and/or treating dyslipidaemias, cardiovascular diseases, syndrome X, restenosis, diabetes, obesity, hypertension, certain cancers, dermatological diseases, and in cosmetics for fighting against skin aging and its effects notably against wrinkles and the like.

(57) Abrégé : La présente invention se rapporte à de nouvelles molécules, leur préparation et leurs utilisations, notamment dans les domaines de la santé humaine et animale et de la cosmétique. Les composés de l'invention sont, en partie, des dérivés d'acides gras et possèdent des propriétés pharmacologiques et cosmétiques avantageuses. L'invention décrit également les différentes utilisations de ces composés, les compositions pharmaceutiques les contenant ainsi que les procédés permettant leur préparation. Les composés de l'invention sont utilisables notamment pour prévenir et/ou traiter les dyslipidémies, les maladies cardiovasculaires, le syndrome X, la resténose, le diabète, l'obésité, l'hypertension, certains cancers, des maladies dermatologiques ainsi qu'en cosmétique pour lutter contre le vieillissement cutané et ses effets notamment contre l'application de rides, etc..

WO 03/014073 A1

## COMPOSES DERIVES D'ACIDES GRAS, PREPARATION ET UTILISATION

La présente invention se rapporte à de nouvelles molécules, leur préparation et  
5 leurs utilisations, notamment dans les domaines de la santé humaine et animale.  
Les composés de l'invention sont, en partie, des dérivés d'acides gras et  
possèdent des propriétés pharmacologiques, anti-oxydantes et anti-  
inflammatoires avantageuses. L'invention décrit également les différentes  
10 utilisations de ces composés, les compositions pharmaceutiques et cosmétiques  
les contenant ainsi que les procédés permettant leur préparation. Les composés  
de l'invention sont utilisables notamment pour prévenir ou traiter les maladies  
cardiovasculaires, le syndrome X, la resténose, le diabète, l'obésité,  
l'hypertension, certains cancers, des maladies dermatologiques ainsi que dans le  
15 domaine cosmétique, pour prévenir ou traiter les effets du vieillissement cutané,  
notamment l'apparition de rides, etc..

L'athérosclérose et ses complications cardiovasculaires sont la principale cause  
de morbidité et de mortalité dans les pays fortement industrialisés.  
L'athérosclérose et ses complications sont également une conséquence  
20 importante du diabète de type II. Un lien strict de cause à effet a été démontré  
entre les dyslipidémies et les maladies cardiovasculaires. Un taux circulant élevé  
de LDL-cholestérol est défavorable. Le risque occasionné par un taux élevé de  
LDL-cholestérol est amplifié par une élévation du taux de triglycérides.  
L'importance de la stabilité des lésions athéroscléreuses dans la survenue  
25 d'accidents cardiovasculaires a en outre été mise en évidence. Le rôle de  
l'oxydation des LDL dans le développement de la plaque d'athérosclérose et de  
sa fragilisation est mieux compris.

Les traitements médicamenteux de l'athérosclérose visent à réduire les taux  
30 circulants de cholestérol ou de triglycérides, à augmenter la stabilité des plaques  
d'athérosclérose, à réduire les contraintes mécaniques auxquelles sont soumis

les vaisseaux (réduction de la tension artérielle) et à réduire les facteurs de risques annexes tels que le diabète.

Parmi les médicaments actuellement utilisés dans le traitement des  
5 dislipidémies, on trouve les fibrates et les statines. Les thiazolidinediones sont utilisées dans le traitement du diabète de type II.

Les fibrates sont largement utilisés pour le traitement des hypertriglycéridémies. Ils ont également des effets favorables au niveau de l'hypercholestérolémie. Ils  
10 sont généralement bien tolérés mais présentent un certain nombre d'effets secondaires : réactions cutanées, effets neurologiques, effets musculaires et gastro-intestinaux. Les effets toxiques sont rares (reins, muscles, articulation, peau, hépatite, etc.). Quant à l'incidence sur le risque cancéreux, elle est importante chez le rongeur même si elle n'a pas été démontrée chez l'homme.

15 Les statines sont largement utilisées pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Il a été démontré que le traitement de patients ayant subi un premier accident vasculaire réduit considérablement le risque de récurrence. Des signes occasionnels ou des symptômes d'hépatites ou de myopathie ont par  
20 ailleurs été décrits.

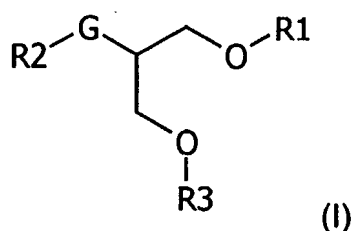
Les thiazolidinediones (troglitazone) ont récemment été introduites pour le traitement de la résistance à l'insuline. De ce fait, le recul nécessaire à une estimation objective de l'ensemble des effets adverses de ces molécules n'est  
25 pas suffisant. Dans ce contexte, l'observation d'une augmentation de la fréquence de tumeurs coliques dans un modèle animal prédisposé au cancer du colon (souris Min portant une mutation du gène APC) est défavorable. Une thiazolidinedione (troglitazone) a d'ailleurs été tout récemment retirée du marché pour des questions de toxicité hépatique.

30 Les principales molécules utilisées dans le traitement médicamenteux de l'athérosclérose (fibrates, statines) ont un spectre d'action pléiotropique. Les

fibrates activent une classe de récepteurs nucléaires (PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , etc.) impliqués dans la coordination de l'expression de protéines responsables du transport ou du métabolisme des lipides. Le caractère pléiotropique du spectre d'action des fibrates réside dans la diversité des gènes cibles des PPARs. Les statines diminuent la synthèse de novo du cholestérol en inhibant l'activité de l'HMG-CoA réductase.

La présente invention propose une nouvelle famille de composés possédant des propriétés pharmacologiques avantageuses et utilisables pour le traitement curatif ou préventif de diverses pathologies.

Les composés de l'invention répondent à la formule générale (I) :



15

dans laquelle :

- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,
- R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent (i) un atome d'hydrogène, (ii) un groupe CO-R dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un groupe de formule CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, n est un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou 1 et encore plus préférentiellement à 0, et R' est un groupe alkyle linéaire ou

ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 13 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO et un groupe SO<sub>2</sub>, l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' tel que défini ci-dessus.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant un composé de formule générale (I).

L'invention concerne également une composition cosmétique comprenant un composé de formule générale (I).

L'invention a aussi pour objet l'utilisation des composés ci-dessus à titre de médicament, pour le traitement de diverses pathologies, notamment de pathologies impliquant une dérégulation du métabolisme des lipides.

L'invention concerne aussi des méthodes de préparation de composés tels que décrits ci-dessus.

Dans les composés de formule générale (I) selon l'invention, le groupe G représente avantageusement un atome d'oxygène ou un groupe N-R4. D'autre part, lorsque G est N-R4, R4 représente préférentiellement un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle.

Dans les composés de formule générale (I) selon l'invention, le ou les groupes R, identiques ou différents, représentent préférentiellement un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, substitué ou non, dont la chaîne principale comporte de 1 à 20 atomes de carbone, encore plus préférentiellement de 7 à 17 atomes de carbone.

Dans les composés de formule générale (I) selon l'invention, le ou les groupes R', identiques ou différents, représentent préférentiellement un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, substitué ou non, dont la chaîne principale comporte de 13 à 20 atomes de carbone, encore plus préférentiellement de 14 à 17 atomes de carbone.

Des exemples particuliers de groupes alkyle à chaîne longue saturée pour R ou R' (e.g., supérieure ou égale à 7 carbone) sont notamment les groupes C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, C<sub>10</sub>H<sub>21</sub>, C<sub>11</sub>H<sub>23</sub>, C<sub>13</sub>H<sub>27</sub>, C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>, C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>, C<sub>17</sub>H<sub>35</sub>, C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>, C<sub>20:5</sub>(5, 8, 11, 14, 17) et C<sub>22:6</sub>(4, 7, 10, 13, 16, 19).

C<sub>20:5</sub>(5, 8, 11, 14, 17) est l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et C<sub>22:6</sub>(4, 7, 10, 13, 16, 19) est l'acide docosahexaénoïque (DHA).

Des exemples de groupes alkyle à chaîne longue insaturée sont notamment les groupes C<sub>14</sub>H<sub>27</sub>, C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>, C<sub>15</sub>H<sub>29</sub>, C<sub>17</sub>H<sub>29</sub>, C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>, C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>, C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>, C<sub>19</sub>H<sub>31</sub>, C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>, C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>, C<sub>21</sub>H<sub>37</sub>, C<sub>21</sub>H<sub>39</sub>, C<sub>23</sub>H<sub>45</sub>.

Des exemples de groupes alkyle à chaîne longue ramifiée sont notamment les groupes (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, (CH=C(CH<sub>3</sub>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>)<sub>n'</sub>-CH=C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ou (CH<sub>2</sub>)<sub>2x+1</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>n''</sub>-CH<sub>3</sub> (x étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 11, n' étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 22, n'' étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 5, n''' étant un nombre entier égal à ou compris entre 0 et 22, et (2x+n''') étant inférieur ou égal à 22).

Dans un mode particulier de mise en oeuvre, le ou les groupes R, identiques ou différents, peuvent également représenter avantageusement un groupe alkyle inférieur comprenant de 1 à 6 atomes de carbone. A titre d'exemple spécifique on peut citer notamment les groupes méthyle, éthyle, propyle et butyle, de préférence méthyle et éthyle.



D'autre part, le groupe alkyle du substituant R ou R' peut également être cyclique, notamment dans le groupe R. Des exemples de groupes alkyle cycliques sont notamment le cyclopropyle, le cyclobutyle, le cyclopentyle et le cyclohexyle.

5

Comme indiqué ci-avant, les groupes alkyle peuvent être éventuellement substitués par un ou plusieurs substituants, identiques ou différents. Les substituants sont choisis de préférence parmi un atome d'halogène (iode, chlore, fluor, brome) et un groupe OH, =O, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, CN, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub> et  
10 COOZ (Z étant un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle, de préférence comportant de 1 à 6 atomes de carbone).

Dans un composé de formule générale (I), les groupes alkyle R et R' peuvent être identiques ou différents. Toutefois, on préfère les composés dans lesquels  
15 les groupes alkyle R' sont identiques entre eux ou présentent une longueur de chaîne similaire, c'est-à-dire ne présentant pas un écart supérieur à 3 atomes de carbone environ.

Un exemple tout particulièrement préféré de groupe R' est un groupe alkyle  
20 saturé et linéaire, comprenant avantageusement de 13 à 17 atomes de carbone, de préférence de 14 à 16, encore plus préférentiellement 14 atomes.

Par ailleurs, dans le groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', X représente tout préférentiellement un atome de soufre ou de sélénium et avantageusement un  
25 atome de soufre.

Par ailleurs, dans le groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', n est de préférence différent de 1 et est en particulier égal à 0.

Un exemple spécifique de groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' selon l'invention est le  
30 groupe CO-CH<sub>2</sub>-S-C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>.

Des composés préférés au sens de l'invention sont donc des composés de formule générale (I) ci-dessus dans laquelle au moins un des groupes R1, R2 et R3 représente un groupe  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  dans lequel X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, de préférence de 14 à 16, encore plus préférentiellement 14 atomes de carbone.

A cet égard, des composés particuliers selon l'invention sont ceux dans lesquels R2 est un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , de préférence dans laquelle X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, plus préférentiellement dans lesquels n est égal à 0, en particulier un groupe de formule  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ .

Dans ces composés, R1 et R3, identiques ou différents, représentent avantageusement un atome d'hydrogène ou un groupe CO-R, de préférence un groupe CO-R.

D'autres composés particuliers selon l'invention sont ceux dans lesquels deux des groupes R1, R2 et R3 sont des groupes  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , identiques ou différents, de préférence dans lesquels X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, plus préférentiellement dans lesquels n est égal à 0, en particulier des groupes  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ .

25

Des composés particulièrement préférés sont les composés de formule générale (I) ci-dessus dans laquelle :

- G est un groupe N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle, et
- au moins deux des groupes R1, R2 et R3 représentent un groupe  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  tel que défini ci-avant, identique ou différent, de préférence identique.

30

D'autres composés préférés sont les composés de formule générale (I) ci-dessus dans laquelle R1, R2 et R3, identiques ou différents, de préférence identiques, représentent un groupe  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  tel que défini ci-avant, de préférence  
5 dans lesquels X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, plus préférentiellement dans lesquels n est égal à 0, et en particulier des groupes  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ .

10 Une autre famille de composés préférés comprend les composés de formule générale (I) ci-dessus dans laquelle l'un des groupes R1, R2 et R3 est un groupe  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  tel que défini ci-avant, un autre des groupes R1, R2 et R3 est un groupe  $\text{CO}-\text{R}$  tel que défini ci-avant et le troisième des groupes R1, R2 et R3 est un atome d'hydrogène.

15 Une famille particulière est celle dans laquelle R1 est un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , de préférence dans laquelle X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, plus préférentiellement dans laquelle  
20 n est égal à 0 et en particulier un groupe  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ . Dans cette famille, l'un et/ou les deux groupes R2 et R3 représentent avantageusement un atome d'hydrogène ou de préférence un groupe  $\text{CO}-\text{R}$ , identique ou non.

25 Une autre famille de composés selon l'invention est celle dans laquelle l'un des substituants R1, R2 ou R3 est un groupe  $\text{COCH}_3$ .

Des composés préférés au sens de l'invention sont ceux, de formule générale (I) décrite ci-dessus, dans laquelle :

- R2 est un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , en particulier  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$  et, de préférence, R1 et R3, identiques ou différents, représentent  
30 un atome d'hydrogène ou un groupe  $\text{CO}-\text{R}$ . De tels composés dans

lesquels R1 et R3, identiques ou différents, représentent tous deux un groupe CO-R sont préférés ; ou

- R1 est un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , en particulier un groupe  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$  et, de préférence, l'un et/ou les deux groupes R2 et R3  
5      représentent un atome d'hydrogène ou un groupe CO-R, identique ou non ; ou
- R1, R2, et R3, identiques, représentent un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , en particulier  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ .

- 10      Des exemples de composés préférés selon l'invention sont représentés sur les Figures 1A et 1B.

Les composés de l'invention peuvent être sous forme de sels, notamment de sels d'addition basiques ou acides, préférentiellement compatibles avec un  
15      usage pharmaceutique ou cosmétique. Parmi les acides pharmaceutiquement ou cosmétiquement acceptables, on peut citer, à titre non limitatif, les acides chlorhydrique, bromhydrique, sulfurique, phosphorique, acétique, trifluoroacétique, lactique, pyruvique, malonique, succinique, glutarique, fumarique, tartrique, maléique, citrique, ascorbique, camphorique, etc.. Parmi les  
20      bases pharmaceutiquement ou cosmétiquement acceptables, on peut citer à titre non limitatif, l'hydroxyde de sodium, l'hydroxyde de potassium, la triéthylamine, la *tert*-butylamine, etc..

L'invention concerne également l'emploi des composés de formule générale (I)  
25      et en particulier ceux décrits ci-avant, dans le domaine pharmaceutique ou cosmétique.

Elle concerne ainsi l'utilisation d'un composé de formule générale (I) et en particulier tel que décrit ci-avant pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour la prévention et/ou le traitement de diverses pathologies,  
30      comme notamment les maladies cardiovasculaires, le syndrome X, la resténose, le diabète, l'obésité, l'hypertension, le cancer ou des maladies dermatologiques. Elle concerne également l'utilisation d'un composé de formule générale (I) et en

particulier tel que décrit ci-avant pour la préparation d'une composition cosmétique pour la protection de la peau, pour lutter contre le vieillissement cutané et ses effets, pour lutter contre l'apparition ou le développement de rides, etc..

5 Ainsi, les composés utilisés dans le domaine pharmaceutique ou cosmétique sont de formule générale (I), dans laquelle :

- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R<sub>4</sub> dans lequel R<sub>4</sub> est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5  
10 atomes de carbone,
- R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub>, identiques ou différents, représentent (i) un atome d'hydrogène, (ii) un groupe CO-R dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un  
15 groupe de formule CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, n est un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou 1 et encore plus préférentiellement à 0, et R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale  
20 comporte de 2 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, l'un au moins des groupes R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> étant un groupe de formule CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' tel que défini  
25 ci-dessus.

Les composés utilisés de préférence dans ce cadre correspondent à des composés de formule (I) dans laquelle R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 9  
30 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe.

Avantageusement, les composés de formule (I) utilisés sont tels que définis ci-dessus.

L'utilisation d'un composé selon l'invention peut en effet permettre de diminuer les taux de triglycérides et de cholestérol circulants, d'inhiber la modification oxydative des LDL, d'induire l'expression d'enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale, d'augmenter les capacités  
5 d'oxydation des acides gras hépatiques, d'induire la croissance des mitochondries dans les fibres musculaires de type I et II, d'activer PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , ou encore de diminuer la croissance des cellules tumorales.

A cet égard, les composés de l'invention possèdent, avantageusement un  
10 tropisme amélioré pour le foie et peuvent donc être administrés par voie orale ou systémique. D'autre part, en raison de leur structure, les composés de l'invention ont un effet durable.

Cette invention a pour but de développer une composition pharmaceutique  
15 comprenant au moins un composé selon l'invention éventuellement accompagné d'un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique.

L'invention concerne également une composition cosmétique comprenant au  
20 moins un composé selon l'invention éventuellement accompagné d'un véhicule cosmétiquement acceptable.

L'invention concerne également une composition nutritionnelle contenant l'un au  
moins des composés tels que définis ci-avant, utilisable seule ou en combinaison avec d'autres agents.

25 La présente invention concerne aussi une méthode de traitement comprenant l'administration à un mammifère d'une quantité efficace d'un composé selon l'invention. Les mammifères concernés peuvent être des animaux domestiques ou non ou des êtres humains.

30 Les composés ou compositions selon l'invention peuvent être administrés de différentes manières et sous différentes formes. Ainsi, ils peuvent être par

exemple administrés de manière systémique, par voie orale, parentérale, par inhalation ou par injection, comme par exemple par voie intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, trans-dermique, intra-artérielle, etc.. Pour les injections, les composés sont généralement conditionnés sous forme de suspensions liquides, qui peuvent être injectées au moyen de seringues ou de perfusions, par exemple. A cet égard, les composés sont généralement dissous dans des solutions salines, physiologiques, isotoniques, tamponnées, etc., compatibles avec un usage pharmaceutique et connues de l'homme du métier. Ainsi, les compositions peuvent contenir un ou plusieurs agents ou véhicules choisis parmi les dispersants, solubilisants, émulsifiants, stabilisants, conservateurs, tampons, etc.. Des agents ou véhicules utilisables dans des formulations liquides et/ou injectables sont notamment la méthylcellulose, l'hydroxyméthylcellulose, la carboxyméthylcellulose, le polysorbate 80, le mannitol, la gélatine, le lactose, des huiles végétales, l'acacia, les liposomes, etc..

Les composés peuvent ainsi être administrés sous forme de gels, huiles, comprimés, suppositoires, poudres, gélules, capsules, aérosols, etc., éventuellement au moyen de formes galéniques ou de dispositifs assurant une libération prolongée et/ou retardée. Pour ce type de formulation, on utilise avantageusement un agent tel que la cellulose, des carbonates ou des amidons.

Les composés peuvent être administrés oralement auquel cas les agents ou véhicules utilisés sont choisis préférentiellement parmi l'eau, la gélatine, les gommes, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le talc, une huile, le polyalkylène glycol, etc..

Pour une administration parentérale, les composés sont préférentiellement administrés sous la forme de solutions, suspensions ou émulsions avec notamment de l'eau, de l'huile ou des polyalkylène glycols auxquels il est possible d'ajouter, outre des agents conservateurs, stabilisants, émulsifiant, etc., des sels permettant d'ajuster la pression osmotique, des tampons, etc..

Pour un usage cosmétique, les composés de l'invention peuvent être administrés sous forme de crème, comme par exemple des crèmes de soin, des crèmes solaires, des huiles, des gels, etc..

5

Il est entendu que le débit et/ou la dose injectée peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction du patient, de la pathologie concernée, du mode d'administration, etc.. Typiquement, les composés sont administrés à des doses pouvant varier entre 1  $\mu$ g et 2 g par administration, préférentiellement de 0,1 mg à 1 g par administration. Les administrations peuvent être quotidiennes ou répétées plusieurs fois par jour, le cas échéant. D'autre part, les compositions selon l'invention peuvent comprendre, en outre, d'autres agents ou principes actifs.

10

15 Les composés de l'invention peuvent être préparés à partir de produits du commerce, en mettant en œuvre une combinaison de réactions chimiques connues de l'homme du métier. L'invention concerne également des procédés de préparation des composés tels que définis ci-avant.

20

Selon un premier procédé de l'invention, les composés de formule (I) dans lesquels G est un atome d'oxygène ou de soufre, R1, R2 et R3 identiques ou différents, représentent un groupe CO-R ou un groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', sont obtenus à partir d'un composé de formule (I) dans laquelle G est respectivement un atome d'oxygène ou de soufre, R2 est un atome d'hydrogène et R1 et R3, 25 identiques ou différents, représentent un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', et d'un composé de formule A°-CO-A dans laquelle A est un groupe réactif choisi par exemple parmi OH, Cl, O-CO-A° et OR'', R'' étant un groupe alkyle, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

30

Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle G est un atome d'oxygène, R2 est un atome d'hydrogène et R1 et R3, identiques ou différents,



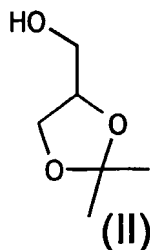
représentent un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', peuvent être obtenus de différentes façons.

Selon un premier mode, on fait réagir une molécule de glycérol avec un composé  
5 de formule A°-CO-A1 dans laquelle A1 est un groupe réactif choisi par exemple parmi OH, Cl et OR'', R'' étant un groupe alkyle, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier. Cette réaction permet la synthèse de composés dits symétriques, dans lesquels R1 et R3 ont la même signification.  
10 Cette réaction peut être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par exemple dans Feuge *et al.*, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1953, **30**, 320-325; Gangadhar *et al.*, *Synth. Commun.*, 1989, **19**, 2505-2514; Han *et al.*, *Biorg. Med. Chem. Lett.*, 1999, **9**, 59-64 ; ou Robinson, *J. Pharm. Pharmacol.*, 1960, **12**, 685-689.

15 Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle G est un atome d'oxygène, R2 est un atome d'hydrogène et R1 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', peuvent également être obtenus à partir d'un composé de formule (I) selon l'invention dans laquelle G est  
20 un atome d'oxygène, R2 et R3 représentent un atome d'hydrogène et R1 est un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' (cette forme particulière de composés de formule (I) étant nommée composés IV), et d'un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', en présence éventuellement  
25 d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier. Cette réaction est avantageusement réalisée selon le protocole décrit par exemple dans Daubert *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1943, **65**, 2144-2145 ; Feuge et Lovegren, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1956, **33**, 367-372 ; Katoch *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, **7**, 2753-2758 ou Strawn *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1989, **32**, 643-648.

30 Les composés IV décrits ci-dessus peuvent être préparés par un procédé comprenant :

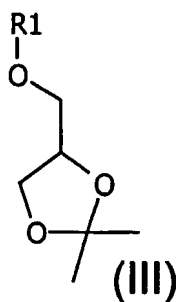
a) réaction d'un composé de formule générale (II)



5

avec un composé de formule  $A^{\circ}-CO-A2$  dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et  $A^{\circ}$  est le groupe R ou le groupe  $(CH_2)_{2n+1}-X-R'$ , en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (III)

10



dans laquelle R1 représente un groupe CO-R ou  $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R'$  ; et

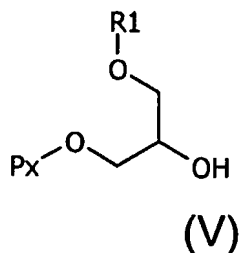
15

b) déprotection du composé (III) par un acide (acide acétique, acide trifluoroacétique, acide borique, acide sulfurique, etc.) pour donner un composé de formule générale (IV) tel que défini ci-avant.

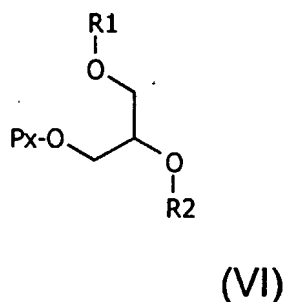
20 Selon un autre procédé particulier de l'invention les composés de formule (I) dans laquelle G est un atome d'oxygène, R3 est un atome d'hydrogène et R1 et R2, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R ou  $CO-(CH_2)_{2n+1}-X-R'$ , peuvent être obtenus à partir d'un composé de formule (I) selon l'invention dans laquelle G est un atome d'oxygène, R2 et R3 représentent un atome

d'hydrogène et R1 est un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' (composés IV), selon les étapes suivantes :

- 5 a) réaction du composé (IV) avec un composé PxE dans lequel Px est un groupement protecteur ; et E est un groupe réactif choisi par exemple parmi OH ou un halogène, pour donner un composé de formule générale (V) dans laquelle R1 est un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R'. La réaction peut avantageusement être mise en œuvre en adaptant le protocole décrit par Gaffney et Reese, *Tet. Lett.*, 1997, **38**, 2539-2542
- 10 dans lequel PxE peut représenter le composé 9-phénylxanthène-9-ol ou le 9-chloro-9-phénylxanthène



- 15 b) réaction du composé de formule (V) avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (VI), dans laquelle R1 et R2, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' et Px est un groupement protecteur
- 20

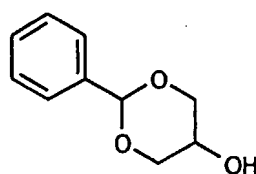


- c) déprotection du composé (VI), en milieu acide pour donner un composé de formule générale (I) dans laquelle G est un atome d'oxygène, R3 est

un atome d'hydrogène et R1 et R2, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R'.

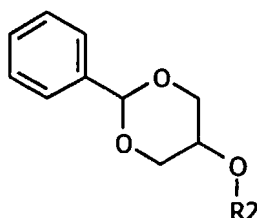
Selon un autre procédé particulier de l'invention, les composés de formule générale (I) dans laquelle G est un atome d'oxygène, R1 et R3 représentent un atome d'hydrogène et R2 représente un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', sont obtenus par un procédé comprenant :

a) la réaction d'un composé de formule (VII)



(VII)

avec un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier pour donner un composé de formule générale (VIII)



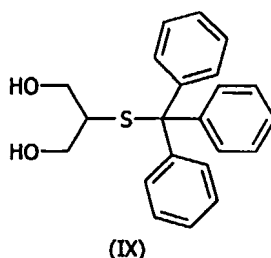
(VIII)

dans laquelle R2 représente un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' ; et

b) déprotection du composé de formule (VIII) en milieu acide ou par hydrogénation catalytique pour donner un composé de formule générale

(I) dans laquelle G est un atome d'oxygène, R1 et R3 représentent un atome d'hydrogène et R2 représente un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R'.

- 5 Les étapes ci-dessus peuvent être réalisées avantageusement selon les protocoles décrits par Bodai *et al.*, *Syn. Lett.*, 1999, 6,759-761 ; Paris *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1980, 23, 9-12 ; Scriba *et al.*, *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 1993, 326 , 477-481 ou Seltzman *et al.*, *Tet. Lett.*, 2000, 41, 3589-3592.
- 10 Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle G est un atome de soufre, R2 est un atome d'hydrogène et, R1 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', peuvent être obtenus à partir du composé de formule (IX) par le procédé suivant :



- 15 a) Réaction du composé IX et d'un premier composé de formule A°-CO-A3 dans laquelle A3 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH, O-CO-A° et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', puis d'un second composé de formule A°-CO-A3 dans laquelle, indépendamment
- 20 du premier composé, A3 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH, O-CO-A° et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier,
- 25 b) Déprotection du groupement thiol par l'acétate mercurique.

Ce procédé est avantageusement réalisé selon le protocole décrit dans Aveta *et al.*, *Gazz. Chim. Ital.*, 1986, 116 (11), 649-652.

Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle G est un atome de soufre, R2 et R3 sont des atomes d'hydrogène et, R1 représente un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', peuvent être obtenus à partir du composé de formule

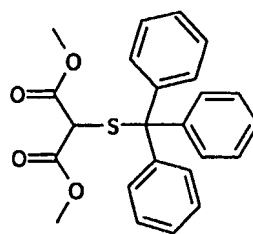
5 (IX) par le procédé suivant :

a) Réaction du composé IX et d'un premier composé de formule A°-CO-A3 dans laquelle A3 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH, O-CO-A° et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' en quantité  
10 stoechiométrique, en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier,

b) Déprotection du groupement thiol par l'acétate mercurique.

15 Le composé de formule (IX) peut être préparé par un procédé comprenant :

a) réaction d'un 2-halogénomalonate de diméthyle avec le tritylthiol pour donner le composé de formule X



(X)

20

b) Réduction des fonctions acétate par LiAlH<sub>4</sub>.

Les composés de formule (I) dans lesquels G est un groupe N-R4 et dans laquelle R1, R2 et R3 identiques ou différents, représentent un groupe CO-R ou  
25 un groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', sont obtenus à partir d'un composé de formule (I) dans laquelle G est un groupe N-R4, R1 et R3 sont des atomes d'hydrogène, R2

un groupe CO-R ou un groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' (composé XI) selon le procédé suivant :

- Réaction d'un composé XI et d'un premier composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', puis d'un second composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle, indépendamment du premier composé, A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

Ce procédé est avantageusement réalisé selon le protocole décrit dans, Terradas *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1993, 115, 390-396.

- Les composés de formule (I) selon l'invention dans laquelle G est un groupe N-R<sub>4</sub> et dans laquelle R<sub>1</sub> et R<sub>2</sub> représentent un groupe CO-R ou CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', et R<sub>3</sub> est un atome d'hydrogène peuvent être obtenus par réaction d'un composé XI et d'un composé de formule A°-CO-A2 dans laquelle A2 est un groupe réactif choisi par exemple entre OH et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' en quantité stœchiométrique, en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

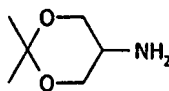
- Les composés de formule (I) selon l'invention dans lesquels G est un groupe NH, R<sub>1</sub> et R<sub>3</sub> sont des atomes d'hydrogène, R<sub>2</sub> un groupe CO-R ou un groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' (composé XIa) peuvent être obtenus de différentes façons.

- Selon un premier procédé, on fait réagir une molécule de 2-aminopropane-1,3-diol avec un composé de formule A°-CO-A dans laquelle A est un groupe réactif choisi par exemple entre OH, O-CO-A°, OR'' et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier.

Cette réaction peut être mise en œuvre en adaptant les protocoles décrits par exemple dans Daniher et Bashkin, *Chem. Commun.*, 1998, **10**, 1077-1078, Khanolkar *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 4515-4519, Harada *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1996, **44** (12), 2205-2212., Kurfuerst *et al.*, *Tetrahedron*, 1993, **49** (32), 6975-6990., Shaban *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 1977, **59**, 213-233, Putnam et Bashkin, *Chem. Commun.*, 2000, 767-768.

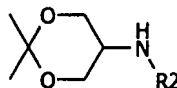
Les composés de formule (I) selon l'invention dans lesquels G est un groupe NH, R1 et R3 sont des atomes d'hydrogène, R2 un groupe CO-R ou un groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' (composé Xia) peuvent également être obtenus selon le procédé suivant :

a) Réaction du composé de formule XII avec un composé de formule A°-CO-A dans laquelle A est un groupe réactif choisi par exemple entre OH, O-CO-A°, OR'' et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier



(XII)

pour donner un composé de formule générale XIII



(XIII)

b) déprotection du composé XIII.

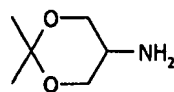
Ce procédé peut avantageusement être mis en œuvre selon le protocole décrit dans Harada *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1996, **44** (12), 2205-2212.

Les composés de formule (I) selon l'invention dans lesquels G est un groupe N-R4 dans lequel R4 n'est pas un atome d'hydrogène, R1 et R3 sont des atomes



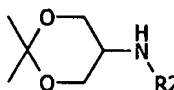
d'hydrogène, R2 un groupe CO-R ou un groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' (composé Xlb) peuvent être obtenus selon le procédé suivant :

- 5 a) Réaction du composé de formule XII avec un composé de formule A°-CO-A dans laquelle A est un groupe réactif choisi par exemple entre OH, O-CO-A°, OR'' et Cl, et A° est le groupe R ou le groupe (CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' en présence éventuellement d'agents de couplages ou d'activateurs connus de l'homme de métier.



(XII)

- 10 pour donner un composé de formule générale XIII



(XIII)

- b) Réaction du composé XIII avec un composé de type R4-A4 dans lequel A4 est un groupe réactif choisi par exemple entre Cl ou Br, en milieu basique,
- 15 c) déprotection du composé XIII.

La faisabilité, la réalisation et d'autres avantages de l'invention sont illustrés plus en détails dans les exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme

20 illustratifs et non limitatifs.

### Légende des figures :

Figure 1A : Structure d'acylglycérols selon l'invention (exemples 2a, 2c, 4a-n).

25

Figure 1B : Structure de composés particuliers selon l'invention (exemples 5a-b).

Figure 2 : Evaluation des effets de l'exemple 4a sur le métabolisme du cholestérol plasmatique chez le rat.

Sur la figure 2A sont représentés les effets du traitement de rats Sprague-Dawley avec l'exemple 4a (300 mg/kg/j) sur la distribution du cholestérol dans les lipoparticules évaluée par chromatographie d'exclusion. On observe une distribution typique du cholestérol dans plusieurs populations de lipoparticules de tailles différentes. En outre, on observe une diminution du cholestérol dans les différentes classes de lipoparticules suite au traitement des animaux avec l'exemple 4a, particulièrement les particules de grande taille (VLDL) et les particules de petite taille (HDL). Cette diminution est caractéristique des effets des activateurs de PPAR $\alpha$ .

Cette diminution se traduit par une diminution du cholestérol plasmatique total comme indiqué dans la figure 2B.

Figure 3 : Evaluation des effets de l'exemple 4a sur le métabolisme des triglycérides plasmatiques chez le rat.

Sur la figure 3A sont représentés les effets du traitement de rats Sprague-Dawley avec l'exemple 4a (300 mg/kg/j) sur la distribution des triglycérides dans les lipoparticules évaluée par chromatographie d'exclusion. On observe une distribution typique des triglycérides principalement localisée dans une population de lipoparticules de grande taille. En outre, on observe une diminution des triglycérides dans cette classe de lipoparticules suite au traitement des animaux avec l'exemple 4a. Cette diminution est caractéristique des effets des activateurs de PPAR $\alpha$ .

Cette diminution se traduit par une diminution des triglycérides plasmatiques comme indiqué dans la figure 3B.

Figure 4 : Evaluation des effets de l'exemple 4a sur le métabolisme des phospholipides plasmatiques chez le rat.

Sur la figure 4A sont représentés les effets du traitement de rats Sprague-Dawley avec l'exemple 4a (300 mg/kg/j) sur la distribution des phospholipides

dans les lipoparticules évaluée par chromatographie d'exclusion. On observe une distribution typique des phospholipides dans plusieurs populations de lipoparticules de tailles différentes. En outre, on observe une diminution des phospholipides dans les différentes classes de lipoparticules suite au traitement  
5 des animaux avec l'exemple 4a, particulièrement les particules de grande taille (VLDL).

Cette diminution se traduit par une diminution des phospholipides plasmatiques totaux comme indiqué dans la figure 4B.

10 Figure 5 : Evaluation des effets de l'exemple 4a sur l'expression de gènes hépatiques chez le rat.

Sur la figure 5A sont représentés les effets du traitement de rats Sprague-Dawley avec l'exemple 4a (300 mg/kg/j) sur l'expression hépatique des gènes  
15 impliqués dans la  $\beta$ -oxydation peroxysomale (ACO) ou mitochondriale (CPT-I et CPT-II) des acides gras. On observe une forte activation de l'expression hépatique de l'ACO, un des principaux gènes cibles de PPAR $\alpha$ , qui suggère une forte activation de la capacité de catabolisme des acides gras par les peroxisomes hépatiques. En parallèle, nous observons une augmentation plus  
20 faible de l'expression des gènes CPT-I et CPT-II qui suggère une activation de la capacité de catabolisme des acides gras par les mitochondries hépatiques.

Sur la figure 5B sont représentés les effets du traitement de rats Sprague-Dawley avec l'exemple 4a (300 mg/kg/j) sur l'expression hépatique des gènes  
impliqués dans le transport du cholestérol (Apo AI) ou des triglycérides (Apo  
25 CIII). On observe une légère diminution de l'expression hépatique de l'Apo AI qui pourrait expliquer en partie la diminution du taux plasmatique de cholestérol. On observe également une diminution plus nette de l'expression de l'Apo CIII qui pourrait expliquer en partie la diminution du taux plasmatique de triglycérides.

30 Figure 6 : Evaluation des effets de l'exemple 4a sur le métabolisme du cholestérol et des triglycérides plasmatiques chez le rat Zucker.

Sur la figure 6A sont représentés les effets du traitement de rats Zucker avec l'exemple 4a (300 mg/kg/j) sur le taux plasmatique de cholestérol total. Les rats Zucker sont des rats résistants à l'action de l'insuline caractérisés par une augmentation graduelle du taux plasmatique de cholestérol. La figure 1a montre  
5 cette évolution dans le groupe contrôle. Elle montre également que cette évolution est freinée par le traitement des animaux avec l'exemple 4a.

Sur la figure 6B sont représentés les effets du traitement de rats Zucker avec l'exemple 4a (300 mg/kg/j) sur le taux plasmatique de triglycérides. Les rats Zucker sont également caractérisés par une augmentation graduelle du taux  
10 plasmatique de triglycérides. La figure 6B montre cette évolution dans le groupe contrôle. Elle montre également que cette évolution est fortement ralentie par le traitement des animaux avec l'exemple 4a.

Figure 7 : Evaluation des effets de l'exemple 4a sur le taux plasmatique  
15 d'insuline et l'équilibre glucidique chez le rat Zucker.

Sur la figure 7 sont représentés les effets du traitement de rats Zucker avec l'exemple 4a (300 mg/kg/j) sur les taux plasmatiques d'insuline et de glucose. Les rats Zucker sont des rats résistant à l'action de l'insuline caractérisés par  
20 une augmentation compensatrice graduelle du taux plasmatique d'insuline. La figure 7A montre cette évolution dans le groupe contrôle. La figure 7B montre que cette évolution est freinée par le traitement des animaux avec l'exemple 4a, notamment après 14 jours. Les taux de glucose étant équivalents dans les deux groupes (figures 7A et 7B), le traitement avec l'exemple 4a augmente donc la  
25 sensibilité à l'insuline.

Figure 8 : Evaluation des effets de l'exemple 4a sur le taux d'insuline lors d'un test de tolérance au glucose chez le rat Zucker.

30 Sur la figure 8 sont représentés les effets du traitement de rats Zucker avec l'exemple 4a (300 mg/kg/j) sur le taux plasmatique d'insuline lors d'un test de tolérance au glucose. Les résultats montrent que les rats traités avec l'exemple

4a utilisent moins d'insuline pour répondre à l'injection de glucose réalisée en début de test. Le traitement avec l'exemple 4a a donc pour effet d'augmenter la sensibilité à l'insuline.

- 5 Figure 9 : Evaluation des effets de l'exemple 4g sur les taux de lipides plasmatiques et sur l'expression d'un gène hépatique chez le rat.

10 Sur les figures 9A et 9B sont représentés les effets du traitement de rats Wistar avec l'exemple 4g (300 mg/kg/j) sur le taux plasmatique de cholestérol et sur la concentration plasmatique des triglycérides respectivement, après 14 jours de traitement. Les résultats montrent que le traitement a pour effet une diminution nette des taux circulants de cholestérol et de triglycérides. Sur la figure 9C est représenté l'effet du traitement de rats Wistar avec l'exemple 4g (300 mg/kg/j) sur l'expression hépatique d'un gène impliqué dans la  $\beta$ -oxydation peroxysomale des acides gras (ACO). On observe une forte activation de l'expression hépatique de l'ACO, un des principaux gènes cibles de PPAR $\alpha$ .

- 20 Figure 10: Evaluation de la dépendance vis-à-vis de la dose de l'effet de l'exemple 4a sur le métabolisme des triglycérides plasmatiques chez le rat Zucker.

25 Sur la figure 10 sont représentés les effets du traitement de rats Zucker avec l'exemple 4a testé à des doses de 0 à 600 mg/kg/j sur le taux plasmatique de triglycérides. Elle montre une diminution graduelle de cette concentration en fonction de la dose de composé.

Figure 11 : Evaluation des effets de l'exemple 4a sur l'activation de PPAR $\alpha$  *in vitro*.

- 30 Sur la figure 11 sont représentés les effets de l'exemple 4a sur l'activation de PPAR $\alpha$  évaluée *in vitro* dans les cellules HepG2, en utilisant une chimère constituée du domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 et du

domaine de liaison du ligand de PPAR $\alpha$ . Les résultats montrent que l'exemple 4a est capable d'activer très fortement le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ , et ceci d'une manière dose dépendante.

- 5 Figure 12 : Evaluation des effets de l'exemple 4a sur l'expression du gène ABCA1 *in vitro* dans les macrophages humains.

10 Sur la figure 12 sont représentés les effets de l'exemple 4a solubilisé selon l'exemple 6, sur l'expression du gène ABCA-1 *in vitro* dans les macrophages humains préparés selon l'exemple 12. Les résultats montrent que l'exemple 4a est capable d'activer très fortement l'expression du gène ABCA1 dans les macrophages humains, et ceci d'une manière dose dépendante.

### **EXEMPLES :**

15

#### **EXEMPLE 1 : Préparation de dérivés d'acides gras**

##### **EXEMPLE 1a : Préparation de l'acide tétradécylthioacétique**

20 L'hydroxyde de potassium (34.30 g, 0.611 mol), l'acide mercaptoacétique (20.9 ml, 0.294 mol) et le 1-bromotétradécane (50 ml, 0.184 mol) sont ajoutés dans l'ordre au méthanol (400 ml). Ce mélange est placé sous agitation pendant une nuit à température ambiante. Au mélange réactionnel précédent est alors ajoutée une solution d'acide chlorhydrique concentré (60 ml) dissous dans l'eau (800 ml). L'acide tétradécylthioacétique précipite. Le mélange est laissé sous  
25 agitation une nuit à température ambiante. Le précipité est ensuite filtré, lavé cinq fois à l'eau puis séché au dessiccateur. Le produit est recristallisé dans le méthanol (rendement 94%).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9-1) : 0.60

F°: 67-68°C

30 IR:  $\nu$ CO acide 1726 et 1684 cm<sup>-1</sup>

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.84-0.95 (t, 3H,  $-\text{CH}_3$ ,  $J = 6.5$  Hz) ; 1.20-1.45 (massif, 22H,  $-\text{CH}_2-$ ) ; 1.55-1.69 (quint, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $J=6.5\text{Hz}$ ) ; 2.63-2.72 (t, 2H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $J = 7.3$  Hz) ; 3.27 (s, 2H,  $\text{S}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ )  
SM : M-1 = 287

5

#### **EXEMPLE 1b: Préparation de l'acide 4-(dodécylthio)butanoïque**

Le dodécánethiol (2.01 g ; 10 mmol) et le bromobutyrate d'éthyle (1.971 g ; 10 mmol) sont placés sous agitation à température ambiante sous atmosphère inerte. L'hydroxyde de potassium (1.36 g ; 21 mmol) dissous dans 50 ml d'éthanol est ajouté lentement. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 3 heures. L'éthanol est évaporé sous vide. Le résidu est repris par l'eau et acidifié. Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau et séché (rendement 90%).

Rf ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 9-1) : 0.46

IR:  $\nu\text{CO}$  acide  $1689\text{ cm}^{-1}$

15 RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.86-0.91 (t, 3H,  $-\text{CH}_3$ ,  $J = 6.2$  Hz) ; 1.25-1.45 (massif, 18H,  $-\text{CH}_2-$ ) ; 1.53-1.63 (quint, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $J=6.7\text{Hz}$ ) ; 1.87-2.00 (quint, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ,  $J=7.2\text{Hz}$ ) ; 2.47-2.55 (m, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) ; 2.55-2.62 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ )

SM : M-1 = 287

20

#### **EXEMPLE 1c : Préparation de l'acide 6-(décylthio)hexanoïque**

Le décanethiol (4.57 g ; 25 mmol) et l'acide 4-bromobutyrique (5 g ; 25 mmol) sont placés sous agitation à température ambiante sous atmosphère inerte. L'hydroxyde de potassium dissous dans 50 ml d'éthanol est ajouté lentement. Le mélange réactionnel est porté à reflux pendant 3 heures. L'éthanol est évaporé sous vide. Le résidu est repris par l'eau et acidifié. Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau et séché (rendement 95%).

Rf ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH 9-1) : 0.37

IR:  $\nu\text{CO}$  acide  $1690\text{ cm}^{-1}$

30 RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.86-0.91 (t, 3H,  $-\text{CH}_3$ ,  $J = 6.5$  Hz) ; 1.22-1.41 (massif, 14H,  $-\text{CH}_2-$ ) ; 1.42-1.50 (m, 2H,  $\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) ; 1.53-1.75

(massif, 6H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ) ; 2.35-2.42 (t, 2H,  $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$ ) ; 2.48-2.55 (massif, 4H,  $-\text{CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-}$ ).

SM : M-1 = 287

## 5 **EXEMPLE 1d : Préparation de l'acide tétradécylsélénocétique**

### Préparation du tétradécylsélénure

Sous atmosphère inerte, du sélénium (1.19 g ; 15 mmol) est introduit dans un mélange THF/eau (1/1) (50 ml). Le mélange réactionnel est refroidi dans un bain de glace avant d'ajouter lentement le tétraborohydrure de sodium (1.325 g ; 35 mmol). Une seconde fraction de sélénium (1.19 ; 15 mmol) est ajoutée. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 15 min puis chauffé à reflux pour dissoudre tous les réactifs. Le bromotétradécane (9 ml ; 30 mmol) dissous dans 25 ml de THF est ajouté. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 3 heures. Le milieu réactionnel est alors extrait au dichlorométhane. Les phases organiques sont groupées, séchées sur du sulfate de magnésium, filtrées et portées à sec. Le produit est utilisé sans autre purification.

R<sub>f</sub> (éther de pétrole) : 0.77

F° : 43°C (cristaux jaunes)

20 IR:  $\nu_{\text{CH}}$  2960-2850  $\text{cm}^{-1}$

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.87-0.93 (t, 6H,  $-\text{CH}_3$ , J = 6.5 Hz) ; 1.20-1.48 (massif, 40H,  $-\text{CH}_2\text{-}$ ) ; 1.62-1.80 (m, 4H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se-}$ ) ; 2.88-2.96 (t, 4H,  $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-Se-}$ ).

### Préparation de l'acide tétradécylsélénocétique

25 Sous atmosphère inerte, le ditétradécylsélénure (8.5 g ; 17 mmol) est dissous dans un mélange THF/eau (150 ml/50 ml) et refroidi dans un bain de glace. Le tétraborohydrure de sodium (2.9 g ; 61 mmol) est ajouté lentement (la solution se décolore) puis est ajouté l'acide bromoacétique (8.5 g ; 61 mmol) dissous dans un mélange THF/eau (25 ml / 25 ml). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 6 heures. Le mélange réactionnel est extrait à l'éther puis la phase aqueuse est acidifiée. Le précipité obtenu est filtré, lavé plusieurs fois à l'eau et séché (rendement 29%).



Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9-1) : 0.60

F°: 68°C

IR: νCO acide 1719 et 1680 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.85-0.95 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.5 Hz) ; 1.25-1.48 (massif, 22H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.65-1.78 (quint, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Se-, J=6.5Hz) ; 2.78-2.84 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Se-, J = 7 Hz) ; 3.18 (s, 2H, Se-CH<sub>2</sub>-COOH)

SM : M-1 = 335

#### **EXEMPLE 1e : Préparation de l'acide tétradécylsulfoxyacétique**

10 L'acide tétradécylthioacétique (5 g ; 17.4 mmol) (exemple 1a) est dissous dans un mélange méthanol/dichlorométhane (160 ml / 80 ml). Le mélange réactionnel est mis sous agitation et refroidi dans un bain de glace avant d'ajouter lentement l'oxone® (12.8 g ; 21 mmol) dissous dans l'eau (160 ml). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 3 heures. Les solvants sont évaporés sous vide. Le précipité formé dans la phase aqueuse résiduelle est essoré, lavé plusieurs fois à l'eau et séché (rendement 90%).

Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9-1) : 0.27

IR: νCO acide 1723 et 1690 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, DMSO) : 0.80-0.92 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.4 Hz) ; 1.19-1.50 (massif, 22H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.55-1.71 (quint, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO-) ; 2.70-2.89 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>-COOH, J=6.7Hz) ; 3.52-3.70 (d, 1H, -CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>-COOH, J=14.5Hz) ; 3.80-3.95 (d, 1H, -CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>-COOH, J=14.1Hz).

SM : M+1 = 305 ; M+23 = 327 (M+Na<sup>+</sup>) ; M+39 = 343 (M+K<sup>+</sup>)

#### **EXEMPLE 1f: Préparation de l'acide 6-(décylsulfoxy)hexanoïque**

Le produit est préparé selon la procédure précédemment décrite (exemple 1e) à partir de l'acide 6-(décylthio)hexanoïque(exemple 1c) rendement 94%.

Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9-1) : 0.18

30 RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.86-0.91 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.8 Hz) ; 1.20-1.40 (massif, 14H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.40-1.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 1.63-1.95 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 2.35-2.42 (m, 3H, -

CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH et -CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ;  
 2.60-2.71 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 2.75-2.85 (m, 1H, -  
 CH<sub>2</sub>-SO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-COOH) ; 2.80-3.01 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-SO-(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-COOH).

#### 5 **EXEMPLE 1g : Préparation de l'acide tétradécylsulfonylacétique**

L'acide tétradécylthioacétique (5 g ; 17.4 mmol) (exemple 1a) est dissous dans un mélange méthanol/dichlorométhane (160 ml / 80 ml). Le mélange réactionnel est placé sous agitation et refroidi dans un bain de glace avant d'ajouter lentement l'oxone® (21.8 g ; 35 mmol) dissous dans l'eau (160 ml). Le mélange  
 10 réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 3 heures. Les solvants sont évaporés sous vide. Le précipité formé dans la phase aqueuse résiduelle est essoré, lavé plusieurs fois à l'eau et séché (rendement 89%).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9-1) : 0.21

15 IR: νCO acide 1701 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, DMSO) : 0.85-0.96 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6 Hz) ; 1.20-1.40 (massif, 22H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.40-1.55 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-) ; 1.80-1.96 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-) ; 3.22-3.34 (t, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH, J=8Hz) ; 4.01 (s, 2H, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH).

20 SM : M-1 = 319

#### **EXEMPLE 1h : Préparation de l'acide 6-(décylsulfonyl)hexanoïque**

Le produit est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 1g) à partir de l'acide 6-(décylthio)hexanoïque (exemple 1c).  
 25 rendement 87%.

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9-1) : 0.15

IR: νCO acide 1689 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.85-0.96 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.5 Hz) ; 1.22-1.40 (massif, 12H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.40-1.61 (massif, 4H, -SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 1.65-1.95 (massif, 6H, -  
 30 CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 2.35-2.46 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-COOH) ; 2.60-2.84 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 2.90-3.02 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH).

**EXEMPLE 1i : Préparation de l'acide docosylthioacétique**

Le produit est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 1a) à partir de l'acide mercaptoacétique et du bromodocosane.

5 Rendement 90%

Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 9-1) : 0.62

IR:  $\nu$ CO acide 1728 et 1685 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.83-0.94 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.6 Hz) ; 1.18-1.48 (massif, 38H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.55-1.69 (quint, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J = 6.7 Hz) ; 2.63-2.72 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J = 7.3 Hz) ; 3.26 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>-COOH)

10

**EXEMPLE 2 : Préparation de monoacylglycérols****EXEMPLE 2a : Préparation du 1-tétradécylthioacétylglycérol**

≈ 15

**Préparation du tétradécylthioacétate de (2,3-O-isopropylidène)propyle**

Dans un ballon immergé dans un bain de glace, l'acide tétradécylthioacétique (4 g, 13.86 mmol) est dissous dans le tétrahydrofurane (100 ml) avant d'ajouter l'EDCI (2.658 g, 13.86 mmol), la diméthylaminopyridine (1.694 g, 13.86 mmol) puis le solketal (1.72 ml, 13.86 mmol) dans cet ordre. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 4 jours. Le solvant est évaporé sous vide. Le résidu est repris par le dichlorométhane, lavé par une solution aqueuse d'HCl 1N puis par une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> 10% et enfin par une solution saturée en NaCl. La phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée sous vide. L'huile résiduelle obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (acétate d'éthyle-cyclohexane 1-9). Le produit est obtenu sous forme d'huile jaune (rendement 80%).

20

25

Rf (cyclohexane-acétate d'éthyle 8-2) : 0.65

IR:  $\nu$ COester 1736 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.86 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 7.8 Hz) ; 1.25 (massif, 20H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub> isopropylidène) ; 1.37 (s, 3H, CH<sub>3</sub> isopropylidène) ; 1.59 (m, 4H, OCO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 2.62 (t, 2H, -O-CO-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-, J = 7.40 Hz) ; 3.25 (s, 2H,

30

-O-CO-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-) ; 3.75 (m, 1H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-CH(isopropylidène)) ; 4.08 (m, 2H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-CHCH<sub>2</sub>(isopropylidène)) ; 4.18 (m, 1H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-isopropylidène) ; 4.35 (m, 1H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-isopropylidène).

#### 5 Préparation du 1-tétradécylthioacétylglycérol

Le tétradécylthioacétate de (2,3-O-isopropylidène)propyle (4.163 g, 10.356 mmol) est dissous dans l'acide acétique (60 ml) et laissé sous agitation à température ambiante. Après 11 jours de réaction, le mélange réactionnel est dilué dans l'eau puis extrait par de l'acétate d'éthyle. La phase organique est lavée par une solution aqueuse saturée en NaCl puis séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et le solvant est évaporé. La poudre blanche obtenue est recristallisée dans l'heptane (rendement 90%).

R<sub>f</sub> (acétate d'éthyle-cyclohexane 5-5) : 0.30

F : 63-65°C

15 IR: νCO<sub>ester</sub> 1720 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.6 Hz) ; 1.28 (massif, 20H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.59 (massif, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-) ; 2.64 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J = 7.23 Hz) ; 3.26 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 3.64 (m, 2H, -COO-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH) ; 3.97 (m, 1H, -COO-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH) ; 4.27 (m, 2H, -COO-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH).

20 SM : M+23 = 385 (M+Na<sup>+</sup>) (M+H non détectée)

#### EXEMPLE 2b : Préparation du 1-palmitoylglycérol

Ce composé est synthétisé selon la procédure précédemment décrite (exemple 2a) à partir du solketal et de l'acide palmitique.

25

*Palmitate de (2,3-O-isopropylidène)propyle*

rendement 55%

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): 0.35

F : 32-33°C

30 IR: νCO<sub>ester</sub> 1733 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.6 Hz) ; 1.27 (massif, 24H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.39 (s, 3H, CH<sub>3</sub> isopropylidène) ; 1.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub> isopropylidène) ; 1.62 (m, 4H,

OCO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 2.32 (t, 2H, -O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J = 7.40 Hz) ; 3.75 (dd, 1H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-CH(isopropylidène), J=8.3Hz et J=2.1Hz) ; 4.10 (m, 2H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-CHCH<sub>2</sub>(isopropylidène)) ; 4.18 (dd, 1H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-isopropylidène, J=11.6Hz et J=4.6Hz) ; 4.33 (m, 1H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-isopropylidène).

5

*1-palmitoylglycérol*

rendement 84%

R<sub>f</sub> (acétate d'éthyle-cyclohexane 5-5) : 0.30

F : 72-74°C

10 IR: νCO<sub>ester</sub> 1730 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.5 Hz) ; 1.26 (massif, 24H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.64 (m, 2H, OCO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 2.36 (t, 2H, -O-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J = 7.40 Hz) ; 3.60 (dd, 1H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH, J=11.8Hz et J=6.1Hz) ; 3.71 (dd, 1H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH, J=11.8Hz et J=3.9Hz) ; 3.94 (m, 1H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH) ; 4.19 (m, 2H, -CO-O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH) ;

15

**EXEMPLE 2c : Préparation du 2-tétradécylthioacétylglycérol**

Préparation du 1,3-benzylidèneglycérol

20 Le glycérol (30 g ; 0.326 mol), le benzaldéhyde (34.5 g ; 0.326 mol) et l'acide p-toluène sulfonique (50 mg) sont dissous dans 350 ml de toluène et placés à reflux dans un appareil de Dean-Stark pendant 18 heures. Le mélange réactionnel est porté à sec. Le produit résiduel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : cyclohexane/acétate d'éthyle 8/2 puis 7/3) puis

25

recristallisé (rendement : 20%)

R<sub>f</sub> (acétate d'éthyle-cyclohexane 5-5) : 0.34

IR: νOH 3286 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 3.19 (sl, 1H échangeable, -OH) ; 3.64 (sl, 1H, -O-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>O-) ; 3.99-4.16 (dd, 2H, -O-CHaHb-CHOH-CHaHbO-, J=1.1Hz et J=10.4Hz) ;

30

4.17-4.23 (dd, 2H, -O-CHaHb-CHOH-CHaHbO-, J=1.6Hz et J=11.5Hz) ; 5.57 (s,

1H,  $\Phi$ -CH-) ; 7.34-7.45 (m, 3H, H aromatiques) ; 7.49-7.55 (m, 2H, H aromatiques).

Préparation du tétradécylthioacétate de (1,3-O-benzylidène)propyle

- 5 Dans un ballon immergé dans un bain de glace, l'acide tétradécylthioacétique (0.800 g, 2.774 mmol) est dissous dans le THF (75 ml) avant d'ajouter l'EDCI (0.532 g, 2.774 mmol), la diméthylaminopyridine (0.339 g, 2.774 mmol) puis le 1,3-benzylidèneglycérol (0.5 g, 2.774 mmol) dans cet ordre. Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 16 heures. Le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est repris par le dichlorométhane, lavé par une solution d'acide chlorhydrique 1N puis par une solution de carbonate de potassium à 10% et enfin par une solution aqueuse saturée en sel. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée et portée à sec. Le résidu est repris dans l'éther de pétrole. Le précipité formé est filtré puis purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle-cyclohexane 2-8) et permet d'obtenir le produit souhaité sous forme de poudre blanche (rendement 50%).

R<sub>f</sub> (acétate d'éthyle-cyclohexane 2-8) : 0.53

F : 51-53°C

- 20 IR:  $\nu_{\text{CO}}$  ester 1723  $\text{cm}^{-1}$

- RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.85-0.96 (t, 3H,  $\text{CH}_3$ ,  $J=6.8\text{Hz}$ ) ; 1.19-1.44 (massif, 20H,  $-\text{CH}_2$ ) ; 1.52-1.69 (massif, 4H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ) ; 2.62-2.80 (t, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ ,  $J=7.2\text{Hz}$ ) ; 3.34 (s, 2H,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ ) ; 4.12-4.29 (dd, 2H,  $-\text{O}-\text{CHaHb}-\text{CHOH}-\text{CHaHbO}-$ ,  $J=1.7\text{Hz}$  et  $J=13.1\text{Hz}$ ) ; 4.30-4.41 (dd, 2H,  $-\text{O}-\text{CHaHb}-\text{CHOH}-\text{CHaHbO}-$ ,  $J=1.3\text{Hz}$  et  $J=13.1\text{Hz}$ ) ; 4.75-4.79 (t, 1H,  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{O}-$ ,  $J=1.7\text{Hz}$ ) ; 5.59 (s, 1H,  $\Phi$ -CH-) ; 7.35-7.45 (m, 3H, H aromatiques) ; 7.48-7.57 (m, 2H, H aromatiques).

Préparation du 2-tétradécylthioacétylglycérol

- 30 Le tétradécylthioacétate de (1,3-O-benzylidène)propyle (0.576 g, 1.278 mmol) est dissous dans un mélange de dioxanne et de triéthylborate (50-50 v/v) avant d'ajouter l'acide borique (0.317 g, 5.112 mmol). Le mélange réactionnel est

chauffé à 100°C pendant 4 heures. Sont encore ajoutés 2 équivalents d'acide borique (0.158 g, 2.556 mmol) puis 2 équivalents après 5.5 heures et 7 heures de réaction. Après 24 heures de réaction, le triéthylborate est évaporé. Le résidu est repris par de l'acétate d'éthyle et lavé par l'eau. La phase aqueuse est  
5 neutralisée avec NaHCO<sub>3</sub> puis extraite avec le dichlorométhane. La phase organique est lavée avec de l'eau saturée en sel, séchée sur MgSO<sub>4</sub>, filtrée et portée à sec. Le résidu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant acétate d'éthyle-cyclohexane 5-5) (rendement 62%).

R<sub>f</sub> (acétate d'éthyle-cyclohexane 7-3) : 0.51

10 IR: νCO ester 1739 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.82-0.95 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.9 Hz) ; 1.15-1.35 (massif, 22H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.55-1.68 (m, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-) ; 2.23 (sl, 2H, OH) ; 2.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-) ; 3.26 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 3.64-3.73 (m, 4H, -COO-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH) ; 3.97 (m, 1H, -COO-CH<sub>2</sub>-CHOH-CH<sub>2</sub>OH).

15

### **EXEMPLE 3 : Préparation de 1,3-diacylglycérols**

#### **EXEMPLE 3a : Préparation du 1,3-dipalmitoylglycérol**

Le glycérol (10 g ; 0.109 mol ; 1eq), l'acide palmitique (55.69 g ; 0.217 mol ; 2  
20 eq), la dicyclohexylcarbodiimide (44.77 g ; 0.217 mol ; 2eq) et la diméthylaminopyridine (26.51 g ; 0.217 mol ; 2eq) sont dissous dans le dichlorométhane. Le mélange réactionnel est placé sous agitation à température ambiante pendant 48 heures. La dicyclohexylurée formée est filtrée et lavée plusieurs fois au dichlorométhane. Le filtrat est porté à sec. Le produit résiduel  
25 est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : dichlorométhane) (rendement : 45%).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : 0.30

F°: 70-73°C

IR: νCO ester 1735 et 1716 cm<sup>-1</sup>

30 RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.86-91 (t, 6H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.5 Hz) ; 1.27 (massif, 48H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.60-1.65 (quint, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.4Hz) ; 2.32-2.38 (t, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-,

$J=7.6$  Hz) ; 2.51-2.52 (d, 1H, OH (échangeable)) ; 4.06-4.21 (massif, 5H,  $-\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-}$ )

SM :  $M+23 = 591$  ( $M+\text{Na}^+$ ) ;  $M+39 = 607$  ( $M+\text{K}^+$ ) ; ( $M+\text{H}$  non détectée)

### 5 **EXEMPLE 3b : Préparation du 1,3-dilinoléylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 3a) à partir du glycérol et de l'acide linoléique. Le produit est obtenu sous forme d'huile incolore (rendement 26%).

Rf ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) : 0.30

10 IR:  $\nu\text{CO}$  ester  $1743$  et  $1719\text{ cm}^{-1}$

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.83-0.93 (t, 6H,  $-\text{CH}_3$ ,  $J = 6.5$  Hz) ; 1.15-1.44 (massif, 28H,  $-\text{CH}_2\text{-}$ ) ; 1.55-1.70 (quint, 4H,  $\text{OCOCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $J=7.4\text{Hz}$ ) ; 1.90-2.15 (massif, 8H,  $-\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$ ) ; 2.30-2.41 (t, 4H,  $\text{OCOCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $J=7.6$  Hz) ; 2.48-2.52 (d, 1H, OH (échangeable)) ; 2.70-2.83 (t, 4H,  $-\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$ ) ; 4.05-4.25 (massif, 5H,  $-\text{CHaHb-CH-CHaHb-}$ ) ; 5.25-5.46 (m, 8H,  $-\text{CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$ ).

15 SM :  $M+23 = 639$  ( $M+\text{Na}^+$ ) ;  $M+39 = 655$  ( $M+\text{K}^+$ ) ; ( $M+\text{H}$  non détectée)

### **EXEMPLE 3c : Préparation du 1,3-distéarylglycérol**

20 Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 3a) à partir du glycérol et de l'acide stéarique. Le produit est obtenu sous forme d'une poudre blanche (rendement 21%).

Rf ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) : 0.30

IR:  $\nu\text{CO}$  ester  $1735$  et  $1716\text{ cm}^{-1}$

25 RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.83-0.91 (t, 6H,  $-\text{CH}_3$ ,  $J = 6.5$  Hz) ; 1.27 (massif, 56H,  $-\text{CH}_2\text{-}$ ) ; 1.59-1.66 (quint, 4H,  $\text{OCOCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $J=7.4\text{Hz}$ ) ; 2.33-2.38 (t, 4H,  $\text{OCOCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $J=7.5$  Hz) ; 2.45-2.47 (d, 1H, OH (échangeable),  $J=4.3\text{Hz}$ ) ; 4.08-4.23 (massif, 5H,  $-\text{CHaHb-CH-CHaHb-}$ ).

SM :  $M+23 = 647$  ( $M+\text{Na}^+$ ) ; ( $M+\text{H}$  non détectée)



**EXEMPLE 3d : Préparation du 1,3-dioléylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 3a) à partir du glycérol et de l'acide oléique. Le produit est obtenu sous forme d'huile incolore (rendement 15%).

5 Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : 0.23

IR: νCO ester 1743 et 1720 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 6H, -CH<sub>3</sub>, J = 7.2 Hz) ; 1.30 (massif, 40H, -CH<sub>2</sub>-) ;  
1.64 (quint, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.4Hz) ; 2.02 (massif, 8H, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-) ;  
2.36 (t, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.2 Hz) ; 2.45 (d, 1H, OH (échangeable), J=4.2Hz) ;  
10 4.18 (massif, 5H, -CHaHb-CH-CHaHb-) ; 5.35 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-).

SM : M+23 = 643 (M+Na<sup>+</sup>) ; (M+H non détectée)

**EXEMPLE 3e : Préparation du 1,3-ditétradécanoylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 3a) à partir du glycérol et de l'acide tétradécanoïque. Le produit est obtenu sous  
15 forme d'une poudre blanche (rendement 30%).

Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : 0.30

IR: νCO ester 1733 et 1707 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 6H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.5 Hz) ; 1.26 (massif, 40H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.62  
20 (quint, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.4Hz) ; 2.36 (t, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.5 Hz) ; 2.45  
(d, 1H, OH (échangeable), J=4.3Hz) ; 4.15 (massif, 5H, -CHaHb-CH-CHaHb-).

**EXEMPLE 3f : Préparation de 1-oléyl-3-palmitoylglycérol**

Le palmitate de glycérol (exemple 2b) ( 5.516 g ; 0.017 mol) est dissous dans le  
25 dichlorométhane (500 ml) avant d'ajouter la dicyclohexylcarbodiimide (5.165 g ;  
0.025 mol), la diméthylaminopyridine (3.058 g ; 0.025 mol) et l'acide oléique  
(4.714 g ; 0.017 mol). Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à  
température ambiante pendant 24 heures. Le précipité de dicyclohexylurée est  
filtré, rincé au dichlorométhane et le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu  
30 obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) et  
permet d'obtenir le composé souhaité sous forme de solide blanc (rendement :  
23%).

Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : 0.24

F : 30°C

IR: νCO ester 1731 et 1710 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.87 (t, 6H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.5 Hz) ; 1.26 (massif, 44H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.62  
 5 (quint, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.4Hz) ; 2.01 (massif, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-) ; 2.36  
 (t, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.3 Hz) ; 2.465 (d, 1H, OH (échangeable), J=4.3Hz) ;  
 4.17 (massif, 5H, -CHaHb-CH-CHaHb-) ; 5.34 (m, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-).  
 SM : M+23 = 617 (M+Na<sup>+</sup>) ; (M+H non détectée)

#### 10 **EXEMPLE 4 : Préparation de 1,2,3-triacylglycérols**

##### **EXEMPLE 4a : Préparation du 1,2,3-tritétradécylthioacétylglycérol**

Le glycérol (1 g, 10.86 mmol) est dissous dans le dichlorométhane (200 ml)  
 avant d'ajouter la dicyclohexylcarbodiimide (7.84 g, 38.01 mmol), la  
 15 diméthylaminopyridine (4.64 g, 38.01 mmol) et l'acide tétradécylthioacétique  
 (9.40 g, 32.58 mmol). Le mélange est laissé sous agitation à température  
 ambiante. Après 48 heures de réaction, le précipité de dicyclohexylurée est filtré,  
 lavé plusieurs fois au dichlorométhane et le filtrat est évaporé. Le résidu obtenu  
 est purifié par chromatographie sur gel de silice (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-cyclohexane 4-6). Le  
 20 1,2,3-tritétradécylthioacétylglycérol est obtenu sous forme de poudre blanche  
 (rendement 65%).

Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Cyclohexane 7-3) : 0.47

F°: 57°C

IR: νCO ester 1738 et 1722 cm<sup>-1</sup>

25 RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 9H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.5 Hz) ; 1.26 (massif, 66H, -CH<sub>2</sub>-) ;  
 1.62 (m, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-) ; 2.63 (t, 6H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J = 7.3 Hz) ; 3.23 (s,  
 6H, S-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 4.27 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=6Hz) ; 4.39  
 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=4.3Hz) ; 5.34 (m, 1H, -CHaHb-CH-  
 CHaHb-)

30 SM : M+23 = 925 (M+Na<sup>+</sup>) ; M+39 = 941 (M+K<sup>+</sup>) ; 903 (M+H non détectée)

**EXEMPLE 4b : Préparation du 1,2,3-tri-(4-dodécylthio)butanoylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 4a) à partir de l'acide 4-(dodécylthio)butanoïque (exemple 1b) et du glycérol.

Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Cyclohexane 7-3) : 0.43

5 IR:  $\nu$ CO ester 1738 et 1727 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.84-0.92 (t, 9H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.3 Hz) ; 1.22-1.44 (massif, 54H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.50-1.64 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 1.83-1.97 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 2.42-2.59 (massif, 18H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 4.11-4.20 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=5.9Hz) ; 4.29-4.36 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=4.5Hz) ; 5.22-5.32 (m, 1H, -CHaHb-CH-CHaHb-)

SM : M+23 = 925 (M+Na<sup>+</sup>) ; M+39 = 941 (M+K<sup>+</sup>) ; 903 (M+H non détectée)

**EXEMPLE 4c : Préparation du 1,2,3-tri-(6-décylthio)hexanoylglycérol**

15 Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 4a) à partir de l'acide 6-(décylthio)hexanoïque (exemple 1c) et du glycérol.

Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Cyclohexane 7-3) : 0.43

IR:  $\nu$ CO ester 1730 cm<sup>-1</sup>

20 RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.85-0.92 (t, 9H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.5 Hz) ; 1.21-1.50 (massif, 48H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.51-1.72 (massif, 18H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 2.28-2.40 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 2.45-2.57 (massif, 12H, -CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-) ; 4.10-4.20 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=6Hz) ; 4.25-4.38 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=4.3Hz) ; 5.22-5.32 (m, 1H, -CHaHb-CH-CHaHb-)

25 SM : M+23 = 925 (M+Na<sup>+</sup>) ; M+39 = 941 (M+K<sup>+</sup>) ; 903 (M+H non détectée)

**EXEMPLE 4d : Préparation du 1,2,3-tritétradécylsulfoxyacétylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 4a) à partir de l'acide tétradécylsulfoxyacétique (exemple 1e) et du glycérol.

30 Rf (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Cyclohexane 7-3) : 0.33

IR:  $\nu$ CO ester 1730 cm<sup>-1</sup>

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.84-0.92 (t, 9H,  $-\text{CH}_3$ ,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ ) ; 1.22-1.39 (massif, 66H,  $-\text{CH}_2-$ ) ; 1.40-1.54 (massif, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}-$ ) ; 2.82-2.89 (massif, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{COO}-$ ) ; 3.68 (s, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) ; 4.20-4.30 (massif, 5H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ).

5 SM :  $M+1 = 951$  ;  $M+23 = 974$  ( $M+\text{Na}^+$ ) ;  $M+39 = 990$  ( $M+\text{K}^+$ )

#### **EXEMPLE 4e : Préparation du 1,2,3-tri-(tétradécylsulfonyl)acétylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 4a) à partir de l'acide tétradécylsulfonylacétique (exemple 1g) et du glycérol.

10 Rf ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Cyclohexane 7-3) : 0.50

IR:  $\nu\text{CO}$  ester  $1741 \text{ cm}^{-1}$

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.84-0.92 (t, 9H,  $-\text{CH}_3$ ,  $J = 6.7 \text{ Hz}$ ) ; 1.22-1.38 (massif, 60H,  $-\text{CH}_2-$ ) ; 1.39-1.48 (massif, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$ ) ; 1.81-1.94 (massif, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$ ) ; 3.21-3.30 (t, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ,  $J=8\text{Hz}$ ) ; 3.95 (s, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) ; 4.23-4.33 (massif, 5H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ).

#### **EXEMPLE 4f : Préparation du 1,2,3-tri-tétradécylsélénocacétylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 4a) à partir de l'acide tétradécylsélénocacétique (exemple 1d) et du glycérol.

20 Rf ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -Cyclohexane 7-3) : 0.74

IR:  $\nu\text{CO}$  ester  $1737$  et  $1721 \text{ cm}^{-1}$

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.85-0.92 (t, 9H,  $-\text{CH}_3$ ,  $J = 6.2 \text{ Hz}$ ) ; 1.23-1.46 (massif, 66H,  $-\text{CH}_2-$ ) ; 1.62-1.76 (massif, 6H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Se}-$ ) ; 2.72-2.79 (t, 6H,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Se}-$ ,  $J=7.4\text{Hz}$ ) ; 3.15 (s, 6H,  $\text{Se}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ) ; 4.13-4.23 (massif, 5H,  $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-$ ).

#### **EXEMPLE 4g : Préparation du 1,3-dipalmitoyl-2-tétradécylthioacétylglycérol**

Le 1,3-dipalmitoylglycérol (5.64 g ; 9.9 mmol ; 1eq), l'acide tétradécylthioacétique (5.74 g ; 19.8 mmol ; 2eq), la dicyclohexylcarbodiimide (4.1 g ; 19.8 mmol ; 2eq) et la diméthylaminopyridine (2.42 g ; 19.8 mmol ; 2eq) sont mis en solution dans le dichlorométhane. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 3 jours. La dicyclohexylurée formée est filtrée et

lavée plusieurs fois au dichlorométhane. Le filtrat est porté à sec. Le produit résiduel est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : dichlorométhane/cyclohexane 4/6) (rendement : 80%).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Cyclohexane 7-3) : 0.32

5 F°: 60-62°C

IR: νCO ester 1744 et 1730 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.86-0.91 (t, 9H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.6 Hz) ; 1.10-1.45 (massif, 70H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.57-1.64 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S- et OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 2.30-2.35 (t, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.4 Hz) ; 2.60-2.66 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J = 7.4 Hz) ; 3.23 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 4.14-4.21 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=5.8Hz) ; 4.30-4.36 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=4Hz) ; 5.26-5.33 (m, 1H, -CHaHb-CH-CHaHb-)

10 SM : M+23 = 861 (M+Na<sup>+</sup>) ; M+39 = 877 (M+K<sup>+</sup>) ; (M+H non détectée)

#### 15 **EXEMPLE 4h : Préparation du 1,3-dilinoléyl-2-tétradécylthioacétylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 4g) à partir du 1,3-dilinoléylglycérol (exemple 3b) et de l'acide tétradécylthioacétique (exemple 1a). Le produit est obtenu sous forme d'huile visqueuse incolore (rendement : 56%).

20 R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Cyclohexane 7-3) : 0.32

IR: νCO ester 1745cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.82-0.93 (t, 9H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.6 Hz) ; 1.15-1.45 (massif, 50H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.52-1.70 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S- et OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 1.93-2.14 (massif, 8H, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-) ; 2.28-2.37 (t, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.5 Hz) ; 2.59-2.67 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J = 7.4 Hz) ; 2.70-2.83 (t, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-) ; 3.22 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 4.12-4.23 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=6.2Hz) ; 4.28-4.37 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=4Hz) ; 5.24-5.45 (m, 1H, -CHaHb-CH-CHaHb-)

25 SM : M+23 = 909 (M+Na<sup>+</sup>) ; M+39 = 925 (M+K<sup>+</sup>) ; (M+H non détectée)

30

**EXEMPLE 4i : Préparation du 1,3-distérayl-2-tétradécylthioacétylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 4g) à partir du 1,3-distéraylglycérol (composé 3c) et de l'acide tétradécylthioacétique (composé 1a).

5 rendement 41%

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : 0.32

IR: νCO ester 1744 et 1731 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.86-0.91 (t, 9H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.6 Hz) ; 1.10-1.45 (massif, 78H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.57-1.64 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S- et OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 2.29-2.35 (t, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.4 Hz) ; 2.60-2.66 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J = 7.4 Hz) ; 3.23 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 4.14-4.21 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=5.8Hz) ; 4.30-4.36 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=4Hz) ; 5.26-5.32 (m, 1H, -CHaHb-CH-CHaHb-)

10

15 **EXEMPLE 4j : Préparation du 1,3-oléyl-2-tétradécylthioacétylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 4g) à partir du 1,3-dioléylglycérol (composé 3d) et de l'acide tétradécylthioacétique (composé 1a).

Le produit est obtenu sous forme d'huile visqueuse incolore (rendement : 32%)

20 R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Cyclohexane 7-3) : 0.50

IR: νCO ester 1746cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 9H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.4 Hz) ; 1.31 (massif, 62H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.60 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S- et OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 2.02 (massif, 8H, -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-) ; 2.33 (t, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.3 Hz) ; 2.63 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J=7.7 Hz) ; 3.23 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 4.18 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12.4Hz et J=6.4Hz) ; 4.33 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12.4Hz et J=4.5Hz) ; 5.33 (massif, 1H, -CHaHb-CH-CHaHb- et -CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-)

25

SM : M+23 = 913 (M+Na<sup>+</sup>) ; M+39 = 929 (M+K<sup>+</sup>) ; (M+H non détectée)

**EXEMPLE 4k : Préparation du 1,3-ditétradécanoyl-2-tétradécylthioacétylglycérol**

Ce composé est obtenu selon la procédure précédemment décrite (exemple 4g) à partir du 1,3-ditétradécanoylglycérol (composé 3e) et de l'acide tétradécylthioacétique (composé 1a). (rendement : 28%).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Cyclohexane 7-3) : 0.30

F°: 60-62°C

IR: νCO ester 1744 et 1730 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.87 (t, 9H, -CH<sub>3</sub>, J = 7.2 Hz) ; 1.27 (massif, 62H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.60 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S- et OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 2.33 (t, 4H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7.7 Hz) ; 2.63 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J = 7.2 Hz) ; 3.23 (s, 2H, S-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 4.18 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=12Hz et J=5.8Hz) ; 4.33 (dd, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-, J=11.5Hz et J=5.8Hz) ; 5.30 (m, 1H, -CHaHb-CH-CHaHb-).

SM : M+23 = 805 (M+Na<sup>+</sup>) ; (M+H non détectée)

**EXEMPLE 4l : Préparation du 1-palmitoyl-2,3-ditétradécylthioacétylglycérol**

Le 1-palmitate de glycérol (4.804 g ; 0.014 mol) est dissous dans le dichlorométhane (300 ml) avant d'ajouter la dicyclohexylcarbodiimide (7.498 g ; 0.036 mol), la diméthylaminopyridine (4.439 g ; 0.036 mol) et l'acide tétradécylthioacétique (8.386 g ; 0.029 mol). Le mélange réactionnel est placé sous agitation à température ambiante pendant 48 heures. Le précipité de dicyclohexylurée est filtré, lavé au dichlorométhane. Le filtrat est porté à sec. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane-cyclohexane 4-6) et donne le composé souhaité sous forme de poudre blanche (rendement 42%).

R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Cyclohexane 7-3) : 0.31

F : 57-59°C

IR: νCO ester 1736 et 1722 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.89 (t, 9H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.6 Hz) ; 1.27 (massif, 68H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.60 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S- et OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) ; 2.33 (t, 2H, OCOCH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, J=7 Hz) ; 2.63 (t, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-, J = 8.9 Hz) ; 3.23 (s, 4H, S-CH<sub>2</sub>-COOH) ; 4.23 (m, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-) ; 4.37 (m, 2H, -CHaHb-CH-CHaHb-) ; 5.31 (m, 1H, -CHaHb-CH-CHaHb-)

SM :  $M+23 = 893$  ( $M+Na^+$ ) ;  $M+39 = 909$  ( $M+K^+$ ) ; ( $M+H$  non détectée)

**EXEMPLE 4m : Préparation du 1-oléyl-3-palmitoyl-2-tétradécylthioacétylglycérol**

- 5 Le 3-oléyl-1-palmitoylglycérol (2 g ; 0.003 mol) est dissous dans le dichlorométhane (150 ml) avant d'ajouter la dicyclohexylcarbodiimide (1.040 g ; 0.005 mol), la diméthylaminopyridine (0.616 g ; 0.005 mol) et l'acide tétradécylthioacétique (1.455 g ; 0.005 mol). Le mélange est laissé sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Le précipité de
- 10 dicyclohexylurée est filtré, rincé au dichlorométhane et le filtrat est concentré. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant  $CH_2Cl_2$ -cyclohexane 4-6) et permet d'obtenir le composé souhaité sous forme d'huile (rendement 49%).

R<sub>f</sub> ( $CH_2Cl_2$ -Cyclohexane 7-3) : 0.45

- 15 F < 4°C

IR:  $\nu_{CO}$  ester  $1742\text{cm}^{-1}$

- RMN ( $^1H$ ,  $CDCl_3$ ) : 0.89 (t, 9H,  $-CH_3$ , J = 6.5 Hz) ; 1.26 (massif, 66H,  $-CH_2-$ ) ; 1.60 (massif, 6H,  $-CH_2-CH_2-CH_2-S-$  et  $OCOCH_2-CH_2-$ ) ; 2.03 (massif, 4H,  $-CH_2-CH=CH-CH_2-$ ) ; 2.33 (t, 4H,  $OCOCH_2-CH_2-$ , J=7.4 Hz) ; 2.63 (t, 2H,  $CH_2-CH_2-S-$ , J = 7.4 Hz) ; 3.23 (s, 2H,  $S-CH_2-COOH$ ) ; 4.18 (dd, 2H,  $-CHaHb-CH-CHaHb-$ , J=12.2Hz et J=6.1Hz) ; 4.33 (dd, 2H,  $-CHaHb-CH-CHaHb-$ , J=12.2Hz et J=4.4Hz) ; 5.32 (massif, 3H,  $-CHaHb-CH-CHaHb-$  et  $-CH_2-CH=CH-CH_2-$ )
- 20

SM :  $M+23 = 887$  ( $M+Na^+$ ) ;  $M+39 = 903$  ( $M+K^+$ ) ; ( $M+H$  non détectée)

- 25 **EXEMPLE 4n : Préparation du 1,3-dipalmitoyl-2-docosylthioacétylglycérol**

Le produit est préparé selon la procédure décrite (exemple 4g) à partir du 1,3-dipalmitoylglycérol (exemple 3a) et de l'acide docosylthioacétique (exemple 1i).

Rendement : 77%

R<sub>f</sub> ( $CH_2Cl_2$ -Cyclohexane 7-3) : 0.32

- 30 IR:  $\nu_{CO}$  ester  $1745$  et  $1730\text{cm}^{-1}$

RMN ( $^1H$ ,  $CDCl_3$ ) : 0.86-0.91 (t, 9H,  $-CH_3$ , J = 6.6 Hz) ; 1.10-1.45 (massif, 86H,  $-CH_2-$ ) ; 1.57-1.64 (massif, 6H,  $-CH_2-CH_2-CH_2-S-$  et  $OCOCH_2-CH_2-$ ) ; 2.29-2.34 (t,



4H,  $\text{OCOCH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $J=7.5$  Hz) ; 2.60-2.66 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}$ ,  $J = 7.4$  Hz) ; 3.23 (s, 2H,  $\text{S-CH}_2\text{-COOH}$ ) ; 4.13-4.22 (dd, 2H,  $\text{-CHaHb-CH-CHaHb-}$ ,  $J=12\text{Hz}$  et  $J=5.8\text{Hz}$ ) ; 4.30-4.36 (dd, 2H,  $\text{-CHaHb-CH-CHaHb-}$ ,  $J=12\text{Hz}$  et  $J=4\text{Hz}$ ) ; 5.27-5.34 (m, 1H,  $\text{-CHaHb-CH-CHaHb-}$ )

5

### **EXEMPLE 5 : Préparation des dérivés 2-aminoglycérol**

#### **EXEMPLE 5a : Préparation du 2-tétradécylthioacétamidopropane-1,3-diol**

L'acide tétradécylthioacétique (2.878 g ; 0.010 mol) et le 2-amino-1,3-propanediol (1 g ; 0.011 mol) sont placés dans un ballon et chauffés  $190^\circ\text{C}$  pendant 1 heure. Après refroidissement à température ambiante, le milieu est repris par du chloroforme et lavé à l'eau. La phase organique est séchée sur  $\text{MgSO}_4$ , filtrée puis évaporée pour fournir un résidu solide ocre. Ce résidu est placé sous agitation dans l'éther diéthylique pendant 12 heures. Le produit est isolé par filtration et fournit une poudre blanche (rendement : 6%).

15

$R_f$  ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -méthanol 9-1) : 0.60

$F^\circ$  :  $95\text{-}97^\circ\text{C}$

IR:  $\nu_{\text{CO}}$  amide  $1640\text{ cm}^{-1}$

RMN ( $^1\text{H}$ ,  $\text{CDCl}_3$ ) : 0.84-0.93 (t, 3H,  $\text{-CH}_3$ ,  $J = 6.4$  Hz) ; 1.21-1.45 (massif, 22H,  $\text{-CH}_2\text{-}$ ) ; 1.54-1.72 (m, 2H,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}$ ) ; 2.52-2.59 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-}$ ,  $J = 7.1$  Hz) ; 2.63 (sl, 2H, OH) ; 3.27 (s, 2H,  $\text{S-CH}_2\text{-COOH}$ ) ; 3.77-3.96 (massif, 4H,  $\text{-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-}$ ) ; 3.97-4.04 (m, 1H,  $\text{-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-}$ ) ; 7.55 (d, 1H,  $\text{-CONH-}$ ,  $J=6.7\text{Hz}$ ).

20

SM :  $M+1=362$  ;  $M+23 = 384$  ( $M+\text{Na}^+$ ) ;  $M+39 = 400$  ( $M+\text{K}^+$ )

25

#### **EXEMPLE 5b : Préparation du 2-tétradécylthioacétamido-1,3-ditétradécylthioacétyloxypropane**

Le 2-tétradécylthioacétamidopropane-1,3-diol (1 g ; 2.77 mmol) (exemple 5a) est dissous dans le dichlorométhane (180 ml) puis la dicyclohexycarbodiimide (1.427 g ; 6.91 mmol), la diméthylaminopyridine (0.845 g ; 6.91 mmol) et l'acide tétradécylthioacétique (1.995 g ; 6.91 mmol) (exemple 1a) sont ajoutés dans cet ordre. Le mélange réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante

30

pendant 48 heures. Le précipité de dicyclohexylurée est filtré et lavé par du dichlorométhane et le filtrat est concentré. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant dichlorométhane-cyclohexane 7-3). Le composé souhaité est obtenu sous forme de poudre blanche (rendement : 66%).

5 R<sub>f</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 10) : 0.18

F° : 82-84°C

IR: νCO ester 1715 et 1730 cm<sup>-1</sup> ; νCO amide 1648 cm<sup>-1</sup>

RMN (<sup>1</sup>H, CDCl<sub>3</sub>) : 0.84-0.95 (t, 3H, -CH<sub>3</sub>, J = 6.6 Hz) ; 1.221-1.45 (massif, 66H, -CH<sub>2</sub>-) ; 1.54-1.69 (massif, 6H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-) ; 2.48-2.55 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-CONH-, J = 7.5 Hz) ; 2.59-2.70 (t, 4H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>-COO-, J = 7.2 Hz) ; 3.24 (s, 6H, S-CH<sub>2</sub>-CO-) ; 4.18-4.35 (massif, 4H, -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-) ; 4.47-4.60 (m, 1H, -CH<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-) ; 7.23 (d, 1H, -CONH-, J=8.5Hz).  
10 SM : M+23 = 924 (M+Na<sup>+</sup>) ; (M+1 non détectée)

15 **EXEMPLE 6 : Méthode de solubilisation des triacylglycérols selon l'invention.**

Les composés selon l'invention décrits dans les exemples 2 à 5 peuvent être solubilisés comme décrit pour l'exemple 4a.

20 Cette solubilisation est utile pour conduire les expériences *in vitro*.

Une émulsion comprenant de l'exemple 4a et de la phosphatidylcholine (PC) est préparée selon le protocole de Spooner et al (Spooner et al JBC, 1988, vol 263, pp 1444-1453). L'exemple 4a est mélangé à la PC selon un rapport 4:1 (w/w)  
25 dans du chloroforme, la mixture est séchée sous azote, puis évaporée toute la nuit sous vide, la poudre qui en résulte est reprise par 0,16 M de KCl contenant 0,01 M d'EDTA puis les particules lipidiques sont dispersées par ultra-sons pendant 30 minutes à 37°C. Les liposomes formés sont ensuite séparés par ultracentrifugation (ultracentrifugeuse XL 80, Beckman Coulter, Villepinte,  
30 France) à 25000 tr/m pendant 45 minutes pour récupérer les liposomes dont la taille est supérieure à 100 nm et se rapproche de celle des chylomicrons. Des

liposomes constitués uniquement de PC sont préparés en parallèle pour servir de témoin négatif.

La composition des liposomes en exemple 4a est estimée en utilisant le kit de dosage enzymocolorimétrique des triglycérides. Le dosage est effectué contre  
5 une gamme standard, préparée grâce au calibrateur des lipides CFAS Réf. N° 759350 (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne). La gamme standard a été construite de 16 à 500 µg/ml. 100 µl de chaque dilution d'échantillon ou de  
gamme étalon sont déposés par puits d'une plaque de titration (96 puits).  
Ensuite 200 µl de réactifs triglycérides Réf. 701912 (Boehringer Mannheim  
10 GmbH, Allemagne) sont rajoutés dans chaque puits, et l'ensemble de la plaque est incubée pendant 30 min. à 37°C. La lecture des Densités Optiques (DO) est effectuée à 492 nm sur le spectrophotomètre. Les concentrations en triglycérides  
de chaque échantillon sont calculées après construction de la courbe étalon  
selon une fonction linéaire  $y=ax+b$ , où  $y$  représente les DO et  $x$  les  
15 concentrations en triglycérides.

Les liposomes de l'exemple 4a, ainsi préparés, peuvent être utilisés dans les expériences *in vitro*.

## 20 **EXEMPLE 7 : Evaluation de l'activation des PPARs *in vitro***

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

25 Les récepteurs nucléaires membres de la sous-famille des PPARs qui sont activés par deux classes majeures de drogues, les fibrates et les glitazones, abondamment utilisées en clinique humaine pour le traitement des dyslipidémies et du diabète, jouent un rôle important dans l'homéostasie lipidique et glucidique. Particulièrement, le récepteur PPAR $\alpha$  module, entre autres, l'expression des  
30 gènes codant pour les apolipoprotéines impliquées dans le transport de lipides et l'expression des gènes ACO d'une part et CPT-I et CPT-II d'autre part, impliqués respectivement dans la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et mitochondriale. Les

exemples suivant montrent que les composés selon l'invention activent PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$  *in vitro*.

L'activation des PPARs est évaluée *in vitro* dans des hépatocytes de rat en culture primaire par la mesure de l'expression de gènes cibles des PPARs et par la mesure de l'activité transcriptionnelle de chimères constituées du domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal4 de levure et du domaine de liaison du ligand des différents PPARs. Ces derniers résultats sont ensuite confirmés dans des lignées cellulaires suivant les protocoles suivants.

10

### 1) Hépatocytes en culture primaire

#### a. Protocole de culture

Les hépatocytes de rats sont isolés par perfusion de foies de rat Wistar OFA mâles (Charles River, L'Arbresle, France) dont le poids corporel est compris entre 175 et 225 g à l'aide d'un mélange de collagénase et de thermolysin (Blendzyme 3, Roche, Bâle, Suisse). Le foie de rats anesthésiés au pentobarbital est perfusé via la veine porte, d'abord par 100 ml d'un tampon de lavage (Liver perfusion medium, Gibco, Paisley, UK) et ensuite par 200 ml du milieu de digestion suivant : HBSS dépourvu de CaCl<sub>2</sub> et MgSO<sub>4</sub> (Sigma, St Louis, MI, USA) supplémenté de 10 mM Hepes, pH 7,6 , de 4 mM CaCl<sub>2</sub> et de 7 mg de Blendzyme 3 suivant une modification du protocole décrit précédemment (Raspé et al. J. Lipid Res. 40, 2099-2110, 1999). Lorsque la viabilité des cellules déterminée par test au Bleu Trypan (Sigma, St Louis, MI, USA) excède 80%, les hépatocytes sont étalés dans des boîtes de culture à 24 puits à raison de 7,5x10<sup>4</sup> cellules/cm<sup>2</sup> pour les expériences de transfection ou dans des boîtes de culture à 6 puits à raison de 10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup> pour les expériences de quantification des ARN messagers. Les cellules sontensemencées et incubées pendant 4 heures dans un milieu de culture Williams E supplémenté de 100 U/ml penicillin (Gibco, Paisley, UK), 2 mM L-Glutamine (Gibco, Paisley, UK), 2 % vol/vol UltroSER SF (Biosepra, Cergy St-Christophe, France), 0,2% masse/vol albumine sérique bovine (Sigma, St Louis, MI, USA), 1  $\mu$ M Dexamethasone

(Sigma, St Louis, MI, USA) et 100 nM T3 (Sigma, St Louis, MI, USA). L'expérience est ensuite poursuivie dans le même milieu de culture dépourvu d'Ultroser. Les composés testés sont ajoutés à la concentration indiquée directement dans le milieu de culture.

5

#### b. Protocole de transfection

Les hépatocytes de rats qui ont été isolés et mis en culture comme décrit ci-dessus sont transfectés dans le milieu de culture dépourvu d'Ultroser pendant  
10 une nuit avec le plasmide rapporteur pG5TkpGL3 (10 ng/puit), les vecteurs d'expression pGal4- $\phi$ , pGal4-mPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\gamma$ , pGal4-hPPAR $\delta$  (10 ng/puit) et le vecteur de contrôle de l'efficacité de transfection pRL-Null (1 ng/puit) (Promega Madison, WI, USA) à l'aide de lipofectine (Gibco, Paisley, UK) ou d'Effecten (QIAGEN, Courtaboeuf, France) suivant le protocole  
15 décrit par le fournisseur. Après transfection, les cellules sont traitées et incubées pendant 36 heures comme décrit précédemment (Raspé et al. J. Lipid Res. 40, 2099-2110, 1999). A l'issue de l'expérience, les cellules sont lysées et les activités luciférase sont déterminées à l'aide du kit de dosage Dual-Luciferase<sup>TM</sup> Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) selon la notice du  
20 fournisseur comme décrit précédemment (Raspé et al. J. Lipid Res. 40, 2099-2110, 1999). Le contenu en protéine des extraits cellulaires est ensuite évalué à l'aide du kit de dosage Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Allemagne) selon la notice du fournisseur.

25

#### c. Description des plasmides utilisés

Le plasmides pG5TkpGL3, pGal4-hPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\gamma$  et pGal4- $\phi$  ont été décrits précédemment (Raspé et al. J. Lipid Res. 40, 2099-2110, 1999). Les constructions pGal4-mPPAR $\alpha$  et pGal4-hPPAR $\delta$  ont été obtenues par clonage  
30 dans le vecteur pGal4- $\phi$  de fragments d'ADN amplifiés par PCR correspondants au domaines DEF des récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$  de souris et PPAR $\delta$  humain.

#### d. Mesure des ARN messagers

- Les ARN messagers ont été extraits d'hépatocytes de rat en culture primaire à l'aide du réactif Tri-Reagent (Sigma, St Louis, MI, USA) suivant les instructions du fournisseur, dosés par spectrophotométrie et quantifiés par RT-PCR semi-quantitative ou quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast Start DNA Master Sybr Green I kit (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse) sur un appareil Light Cycler System (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse). Des paires d'amorces spécifiques des gènes ACO et Apo AII, cibles de PPAR $\alpha$  ont été utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes 36B4,  $\beta$ -actine et GAPDH ont été utilisées comme sondes témoins (Cf. tableau I ci-dessous).

**Tableau I :**

nom	séquence	PCR semi quantitative		PCR quantitative		gène
		Tm	nbr cycle	Tm	nbr cycle sortie	
ApoAI_r_1_s 741	GCCTGAATCTCCTGG ACAACCTG	58°C	25	58°C	18 à 20	Apo AI
ApoAI_r_1_as 742	ATGCCTTTGCATCTC CTTCG					
ApoB_r_1_s 743	ATACAGCCTGAGTGA GCCTCTTCAG	55°C	30	X	X	Apo B
ApoB_r_1_as 744	CCAGGGAGTTGGAGA CCGTG					
GAPDH_h_1_s 390	GACATCAAGAAGGTG GTGAA	55°C	25	55°C	20 (variable)	GAPDH
GAPDH_h_1_as 389	CCACATACCAGGAAA TGAGC					
beta-actine_h_1_s 189	TTCAACTCCATCATG AAGTGTGAC	55°C	25	55°C	variable	β actine
beta-actine_h_1_as 188	TCGTCATACTCCTTG CTTGCTGATCC					
CPT1_r_1_s 517	GCTGGCTTATCGTGG TGGTG	60°C	25	60°C	20 à 25	CPT-I
CPT1_r_1_as 516	GACCTGAGAGGACCT TGACC					
36B4_h_1_s 177	CATGCTCAACATCTC CCCCTTCTCC	X	X	55°C	23	36B4
36B4_h_1_as 178	GGGAAGGTGTAATCC GTCTCCACAG					
ACOX1_r_1_as 457	CGCATCCATTTCTCC TGCTG	60°C	25	60°C	18 à 24	ACO
ACOX1_r_1_s 458	TTCTGTGCGCCACCTC CTCTG					
ApoCIII_r_1_s 797	ATGCAGCCCCGAATG CTCCTCATCGTGG	55°C	30	55°C	28 à 30	Apo CIII
ApoCIII_r_1_as 798	TCACGGCTCAAGAGT TGGTGTTAC					
CPT2_r_1_s 725	CAGAAGCCTCTCTTG GATGACAG	55°C	25	X	X	CPT-II
CPT2_r_1_as 726	TTGGTTGCCCTGGTA AGCTG					
ABCA1_h_2_s	CTGAGGTTGCTGCTG TGGAAG	65°C	21	X	X	ABCA1
ABCA1_h_2_as	CATCTGAGAACAGGC GAGCC					

## 2) Lignées cellulaires

### a. Protocoles de culture

5

Les cellules HepG2 et RK13 proviennent de l' ECACC (Porton Down, UK) et sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10% vol/vol sérum de veau foetal, 100 U/ml penicillin (Gibco, Paisley, UK) et 2 mM L-Glutamine (Gibco, Paisley, UK). Le milieu de culture est changé tous les deux jours. Les cellules  
10 sont conservées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% CO<sub>2</sub> et 95% d'air.

### b. Transfection

15 Les cellules HepG2 et RK13 ensemencées dans des boîtes de culture 24 puits à raison de 10<sup>5</sup> cellules/puits pour les HepG2 et 5x10<sup>4</sup> cellules/puit pour les cellules RK13 sont transfectées pendant 2 heures avec le plasmide rapporteur pG5TkpGL3 (10 ng/puit), les vecteurs d'expression pGal4- $\phi$ , pGal4-mPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\alpha$ , pGal4-hPPAR $\gamma$ , pGal4-hPPAR $\delta$  (10 ng/puit) et le vecteur de  
20 contrôle de l'efficacité de transfection pRL-null (Promega Madison, WI, USA) (20 ng/puit) suivant le protocole décrit précédemment (Raspé et al. J. Lipid Res. 40, 2099-2110, 1999) et incubées pendant 36 heures avec les composés testés. A l'issue de l'expérience, les cellules sont lysées (Gibco, Paisley, UK) et les activités luciférase sont déterminées à l'aide du kit de dosage Dual-Luciferase<sup>TM</sup>  
25 Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) selon la notice du fournisseur comme décrit précédemment (Raspé et al. J. Lipid Res. 40, 2099-2110, 1999). Le contenu en protéine des extraits cellulaires est ensuite évalué à l'aide du kit de dosage Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Allemagne) selon la notice du fournisseur.

30



Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 11 et montrent que les composés testés sont capables d'activer très fortement le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ .

5 **EXEMPLE 8 : Evaluation des effets sur le métabolisme lipidique *in vivo***

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

- 10 Les fibrates, abondamment utilisés en clinique humaine pour le traitement des dislipidémies impliquées dans le développement de l'athérosclérose, une des principales cause de mortalité et de morbidité dans les sociétés occidentales, sont de puissants activateurs du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$ . Celui-ci régule l'expression de gènes impliqués dans le transport (apolipoprotéine telles que Apo
- 15 AI, ApoAII et ApoC-III, transporteurs membranaires tels que FAT) ou le catabolisme des lipides (ACO, CPT-I ou CPT-II). Un traitement par les activateurs de PPAR $\alpha$  se traduit donc chez le rongeur par une diminution des taux circulants de cholestérol et de triglycérides.
- 20 Les protocoles suivant permettent de mettre en évidence une baisse du taux de triglycérides et du taux de cholestérol circulant, ainsi que l'intérêt des composés selon l'invention dans le cadre de la prévention et/ou du traitement des maladies cardio-vasculaires.
- 25 1) Traitement des animaux

Des rats Sprague-Dawley ou Wistar de 200 à 230 g (Charles River, L'Arbresle, France) sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une température constante de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Après une acclimatation d'une semaine, les

30 rats sont pesés et rassemblés par groupes de 8 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution de taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides soient uniformes. Les composés testés sont suspendus dans la

carboxymethylcellulose et administrés par gavage intra-gastrique, à raison d'une fois par jour pendant 15 jours aux doses indiquées. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. A l'issue de l'expérience les animaux sont pesés et sacrifiés sous anesthésie après un jeûne de 5 heures. Le sang est collecté sur  
5 EDTA. Le plasma est préparé par centrifugation à 3000 tours/minutes pendant 20 minutes. Des échantillons de foie sont prélevés et conservés congelés dans l'azote liquide pour analyse ultérieure.

## 2) Mesure des lipides et apolipoprotéines sériques

10

Les concentrations plasmatiques des lipides (cholestérol total et cholestérol libre, triglycérides et phospholipides) sont mesurées par dosage colorimétrique (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les indications du fournisseur. Les concentrations plasmatiques des apolipoprotéines AII, AI et CIII sont mesurées  
15 selon les méthodes décrites précédemment (Raspé et al. J. Lipid Res. 40, 2099-2110, 1999, Asset G et al., Lipids, 34, 39-44, 1999).

Pour séparer les lipoproteines selon leur taille, 300 µL de plasma sont injectés sur une colonne Sepharose 6HR 10/30 (Pharmacia, Uppsala, Suède) et élués à flux constant (0,2 ml/minute) avec du PBS (pH 7,2). La densité optique de  
20 l'effluent est enregistrée à 280 nm. L'effluent est collecté par fraction de 0,3 ml. Les concentrations de lipides dans les différentes fractions sont mesurées par dosage colorimétrique (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les indications du fournisseur.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 2, 3, 4, 9A et 9B.

25

## 3) Analyse des ARNs

L'ARN total a été isolé des fragments de foie par extraction à l'aide du mélange thiocyanate de guanidine/phénol acide/chloroforme suivant le protocole décrit  
30 précédemment (Raspé et al. J. Lipid Res. 40, 2099-2110, 1999). Les ARN messagers ont été quantifiés par RT-PCR semi-quantitative ou quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast Start DNA Master Sybr Green I kit (Hoffman-La

Roche, Basel, Suisse) sur un appareil Light Cycler System (Hoffman-La Roche, Basel, Suisse). Des paires d'amorces spécifiques des gènes ACO, Apo CIII, Apo AI, CPT-I et CPT-II ont été utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes 36B4,  $\beta$ -actine et GAPDH ont été utilisées comme sondes

5 témoins (Cf. tableau I).

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 5 et 9C.

### **EXEMPLE 9 : Evaluation des propriétés antioxydantes des composés selon l'invention**

10

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

15

L'oxydation des LDL est à la base du processus inflammatoire qui conduit à l'athérosclérose et aux maladies cardiovasculaires. Les composés qui retardent ou inhibent cette oxydation présentent donc des effets protecteurs bénéfiques.

1. Protection de l'oxydation des LDL par le cuivre ou le dihydrochloride d'azobis (2-amidinopropane) (AAPH) :

20

L'oxydation des LDL est une modification importante et joue un rôle prépondérant dans la mise en place et le développement de l'athérosclérose (Jurgens, Hoff et al. 1987). Le protocole suivant permet la mise en évidence des propriétés antioxydantes des composés. Sauf mention différente, les réactifs proviennent de chez Sigma (St Quentin, France).

25

Les LDL sont préparés suivant la méthode décrite par Lebeau et al. (Lebeau, Furman et al. 2000).

Les solutions de composés à tester sont préparées pour avoir des concentrations finales allant de 1 à 100  $\mu$ M pour une concentration totale d'éthanol de 1% (v/v).

30

- Avant l'oxydation, l'EDTA est retiré de la préparation de LDL par dialyse contre du PBS. La cinétique d'oxydation a ensuite lieu à 30°C en ajoutant 20 µl d'une solution à 16,6 µM de CuSO<sub>4</sub> ou de 2 mM de AAPH à 160 µL de LDL (125 µg de protéines/ml) et 20 µl d'une solution du composé à tester. La
- 5 formation de diènes, l'espèce à observer, se mesure par densité optique à 234 nm dans les échantillons traités avec les composés mais avec ou sans cuivre (ou AAPH). La mesure de la densité optique à 234 nm est réalisée toutes les 10 minutes pendant 8 heures à l'aide d'un spectrophotomètre thermostaté (Kontron Uvikon 930). Les analyses sont réalisées en triplicata.
- 10 L'activité des composés est exprimée en pourcentage de décalage de « lag-phase » (phase de latence avant le démarrage de l'oxydation) comparée à celle du contrôle. Nous considérons que les composés ont une activité antioxydante de 100% lorsqu'ils doublent le décalage de la lag-phase de l'échantillon témoin. Les inventeurs mettent en évidence que les composés
- 15 selon l'invention, décrits dans les exemples 2 à 5, retardent l'oxydation des LDL (induite par le cuivre), ceci indiquant que les composés selon l'invention possèdent un caractère antioxydant intrinsèque.

2. Evaluation de la protection conférée par les composés selon l'invention
- 20 vis-à-vis de la peroxydation lipidique :

- La mesure de l'oxydation des LDL est réalisée par la méthode des TBARS. Selon le même principe que celui décrit précédemment, les LDL sont oxydés avec du CuSO<sub>4</sub> et la peroxydation lipidique est déterminée de la manière
- 25 suivante :

- Les TBARS sont mesurés à l'aide d'une méthode spectrophotométrique, l'hydroperoxydation lipidique est mesurée en utilisant l'oxydation peroxyde-lipide dépendante de l'iodure en iode . Les résultats sont exprimés en nmol de malondialdéhyde (MDA) ou en nmol d'hydroperoxyde/mg de protéines.
- 30 Les résultats obtenus précédemment, en mesurant l'inhibition de la formation de diénés conjugués, sont confirmés par les expériences de mesure de peroxydation lipidique des LDL. Les composés selon l'invention protègent

également de manière efficace les LDL contre la peroxydation lipidique induite par le cuivre (agent oxydant).

L'exemple 9 indique que les composés selon l'invention inhibent la modification oxydative des LDL.

**EXEMPLE 10 : Evaluation des effets sur l'expression d'enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale**

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

Les acides gras constituent une réserve essentielle d'énergie. La  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale des acides gras sont les principales voies de catabolisme des acides gras responsables de la mobilisation de cette énergie. Ces deux processus jouent donc un rôle primordial dans le contrôle des taux sériques d'acide gras libres ainsi que dans la régulation de la synthèse des triglycérides. L'enzyme qui détermine la vitesse de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale est l'ACO. La  $\beta$ -oxydation mitochondriale est limitée par le transport des acides gras au sein de la mitochondrie. Celui-ci dépend de l'activité des enzymes CPT-I et CPT-II. La régulation de l'expression des enzymes ACO, CPT-I et CPT-II joue un rôle primordial dans le contrôle de  $\beta$ -oxydation peroxysomale et mitochondriale, respectivement.

Les composés selon l'invention induisent l'expression de l'ACO, de CPT-I et de CPT-II. Cette activité est mise en évidence de la manière suivante :

L'ARN isolé d'hépatocytes en culture primaire décrits dans l'exemple 7 ou de fragment de foie prélevé sur des rats traités avec les composés testés comme décrit dans l'exemple 8 sont quantifiés par RT-PCR semi-quantitative ou quantitative comme décrit dans les exemples 7 et 8 à l'aide de paires d'amorces spécifiques des gènes ACO, CPT-I et CPT-II.

**EXEMPLE 11 : Evaluation des capacités d'oxydation des acides gras**

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est  
5 décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

Les capacités d'oxydation des acides gras déterminent les taux sériques  
d'acides gras libres ainsi que la possibilité de synthèse des triglycérides. Une  
accumulation d'acide gras libres dans le sang ou de triglycérides en dehors du  
10 tissu adipeux favorisent la résistance à l'insuline. D'autre part, une élévation des  
taux plasmatiques de triglycérides est actuellement considérée comme un  
facteur de risque de maladies cardiovasculaires. Une augmentation des  
capacités d'oxydation des acides gras présente donc un intérêt thérapeutique.

15 Les composés selon l'invention activent l'oxydation des acides gras par les  
mitochondries et les peroxysomes. Cette capacité est mise en évidence de la  
manière suivante :

On teste les activités CPT-I et CPT-II mitochondriales selon le protocole décrit  
20 par Madsen et al, 1999, Biochem Pharmacol. 57, 1011-1019.

On teste l'activité ACO selon le protocole décrit par Asiedu et al, 1995, Eur. J.  
Biochem, 227, 715-722.

On teste la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale des acides gras selon le  
protocole décrit par Hovik et al, 1990, Biochem J. 270, 167-173.

25

**EXEMPLE 12 : Evaluation des effets sur le transport inverse du cholestérol**

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est  
décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

30

La corrélation négative entre le taux d'HDL-cholestérol et les maladies  
cardiovasculaires est aujourd'hui bien connue. La capacité d'un composé à

augmenter le transport inverse du cholestérol (RCT) est considérée comme un mécanisme par lequel les HDL protègent de l'athérosclérose.

Le RCT est un processus qui permet au cholestérol, en excès dans les tissus extra-hépatiques, d'être récupéré et exporté vers le foie où il est converti en acides biliaires avant d'être excrété dans la bile.

La présence de cellules spumeuses dérivées de macrophages est une des caractéristiques des premières étapes de la formation de la lésion d'athérosclérose.

L'efflux du cholestérol des macrophages est donc une phase critique pour la prévention de la formation des cellules spumeuses et, par conséquent, présente un effet protecteur vis-à-vis de l'athérosclérose. L'étape cruciale du RCT est le transfert du cholestérol en excès et des phospholipides des membranes cellulaires aux HDL naissantes. A ce titre, le transporteur ABCA1 (ATP binding cassette A1) joue un rôle clef dans ce processus et son expression est corrélée avec la réduction du développement de la plaque d'athérosclérose en stimulant l'efflux de cholestérol dans les macrophages.

D'autre part, il a récemment été démontré que ABCA1 est un gène cible du récepteur nucléaire LXR $\alpha$ , lui même gène cible des récepteurs PPAR $\alpha$  et de PPAR $\gamma$ .

Les composés selon l'invention induisent l'expression de LXR $\alpha$  et d'ABCA1 et stimulent l'efflux du cholestérol dans 2 modèles *in vitro* de macrophages THP1 et primaires.

1/ mesure de l'expression d'ABCA1 et de LXR $\alpha$ :

a/ Différentiation et traitement des macrophages humains THP-1 et primaires

Des monocytes THP-1 (ATCC, Rockville, Maryland) sont étalés dans des boîtes de culture à 6 puits en présence de PMA (Phorbol myristate acetate) et de sérum de veau fœtal et incubées à 37°C pendant 48h, ce qui permet leur différenciation en macrophages.

En ce qui concerne les macrophages primaires, les cellules mononuclées sont isolées à partir de sang humain comme précédemment décrit (Chinetti et al. Nat. Medecine 7(1), 53-58, 2001) et sont étalées sur des plaques 6 puits et cultivées pendant 10 jours en présence de sérum humain pour permettre l'adhérence et la

5 différenciation des monocytes primaires en macrophages.

Le traitement à l'aide des différents composés est réalisé pendant 48h dans un milieu sans sérum humain ou de veau foetal mais supplémenté avec du sérum Nutridoma HU (Boehringer) à 1%.

10 b/ Mesures des ARNs messagers

Les ARNs totaux ont été extraits des macrophages traités à l'aide du kit RNeasy mini (QIAGEN, Hilden, Germany) suivant les instructions du fournisseur, dosés par spectrométrie et quantifiés par RT-PCR quantitative à l'aide du kit Light

15 Cyclyer Fast DNA Master Green I (Hoffman-La Riche, Basel, Suisse) sur un appareil Light Cyclyer System (Hoffman-La Riche, Basel, Suisse). Des paires d'amorces spécifiques des gènes ABCA1 & LXR $\alpha$  ont été utilisées comme sondes.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 12.

20

2/ mesure de l'efflux de cholestérol:

a/ Différentiation et traitement des macrophages humains THP-1 et primaires

25 Les macrophages sont différenciés à partir de monocytes THP-1 ou primaires comme dans l'expérience précédente (1/ mesure de l'expression d'ABCA1 et de LXR $\alpha$ )

b/ Chargement des macrophages en cholestérol et mesure de l'efflux

30

Les macrophages sont pré-traités pendant 24 h avec les composés, mais aussi chaque 24h pendant toute la durée de l'expérience. Ils sont chargés en



cholestérol lors d'une incubation de 48h en présence de LDL acétylées (50 µg/ml contenant du cholestérol marqué au Tritium) dans un milieu RPMI 1640 supplémenté avec 1% de Nutridoma HU (Boehringer).

5 Après cette étape, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS et incubées pendant 24h dans du milieu RPMI sans Nutridoma avec ou sans apolipoprotéine A-I. A la fin de cette étape, le milieu est récupéré et les lipides intracellulaires sont extraits dans un mélange hexane / isopropanol, et séchés sous azote.

10 L'efflux est quantifié à l'aide d'un lecteur à scintillation Tri-Carb® 2100 TR (Packard, Meriden, CT, USA) en divisant le nombre de coups comptés dans le milieu par le nombre de coups total comptés dans le milieu et dans les cellules.

**EXEMPLE 13 : Evaluation des effets sur le syndrome métabolique (syndrome X) et le diabète**

15 Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

20 La résistance à l'insuline est à la base du syndrome métabolique caractérisé par une intolérance au glucose, une hyperinsulinémie, une dislipidémie et l'hypertension. La combinaison de plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire qui se traduit par un risque accru de maladies cardiovasculaires consécutives à l'athérosclérose est responsable de la majorité de la mortalité et de la morbidité liée au diabète de type II. Les traitements médicamenteux du syndrome métabolique ont donc pour principale cible la résistance à l'insuline.

25

Les composés selon l'invention réduisent les manifestations du syndrome métabolique (Syndrome X) telles que l'élévation des acides gras libres, l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie et la réponse insulinémique au glucose (test de tolérance au glucose) et le diabète dans deux modèles animaux qui  
30 présentent une résistance à l'insuline à l'origine du syndrome métabolique, les souris C57BL/6 maintenues sous régime riche en graisse et le rat Zucker obèse (fa/fa). Ces propriétés sont mises en évidence de la manière suivante :

## 1) Traitement des animaux

Des souris C57BL/6 (Charles River, L'Arbresle, France) mâles âgées de 6  
5 semaines au début de l'expérience ont été aléatoirement rassemblées par  
groupes de 6 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution de leur poids  
corporel soit uniforme. Les souris ont reçu un régime pauvre en graisse (UAR  
AO4), un régime enrichi en graisse (huile de coco 29% poids/poids) ou le même  
régime enrichi complété avec les composés étudiés. Des rats Zucker mâles  
10 obèses (fa/fa) ou non obèses (fa/+) âgés de 5 semaines ou de 21 semaines  
(Charles River, L'Arbresle, France) rassemblés par groupes de 8 animaux  
sélectionnés de telle sorte que la distribution de taux plasmatiques de cholestérol  
et de triglycérides soient uniformes sont maintenus sous régime standard. Les  
animaux sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une  
15 température constante de  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Les animaux ont un accès libre à l'eau et à  
la nourriture. La prise de nourriture et la prise de poids sont enregistrées. Les  
composés testés sont suspendus dans la carboxyméthylcellulose et administrés  
par gavage intra-gastrique, à raison d'une fois par jour pendant 15 jours aux  
doses indiquées. A l'issue du traitement, certains animaux subissent un test de  
20 tolérance au glucose comme décrit ci-dessous. A l'issue de l'expérience les  
autres animaux sont pesés et sacrifiés sous anesthésie après un jeûne de 5  
heures. Le sang est collecté sur EDTA. Le plasma est préparé par centrifugation  
à 3000 tours/minutes pendant 20 minutes. Des échantillons de foie sont prélevés  
et conservés congelés dans l'azote liquide pour analyses ultérieures.

25

## 2) Dosage des acides gras libres et des lipides

Les taux d'acides gras libres sont variables chez les rats diabétiques. La  
concentration en acides gras libres dans le sérum ou le plasma, est mesurée par  
30 réaction enzymatique colorimétrique « NEFA/FFA » WAKO (Labo immuno  
systems, Neuss, Allemagne) sur du sérum ou du plasma.

Les concentrations plasmatiques des lipides (cholestérol total et triglycérides) sont mesurées par dosage colorimétrique (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) selon les indications du fournisseur.

Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 6 et 10.

5

### 3) Dosage de la glycémie

La mesure de la glycémie s'effectue par une réaction enzymatique colorimétrique (Sigma Aldrich, St Louis, MO).

10 Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7.

### 4) Dosage de l'insuline

Afin de mettre en évidence une hyperinsulinémie caractéristique des maladies  
15 métaboliques, les taux d'insuline sont dosés en utilisant le kit de dosage radioactif (Mercodia, Uppsala, Suède). L'insulinémie est déterminée sur des sérums ou des plasmas récoltés sur EDTA.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7.

### 20 5) Test de tolérance au glucose

Les animaux ont été anesthésiés après un jeûne de 8 h par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (50 mg/kg). Pour initier le test de tolérance au glucose, une injection de glucose (1 g/kg) est réalisée dans la cavité  
25 intrapéritonéale avant de collecter des échantillons de sang au niveau de la veine caudale sur des tubes héparinés 0, 15, 30, 45, et 60 minutes après la charge en glucose. Les échantillons sont conservés sur glace, le plasma isolé et conservé à -20°C avant analyse.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 8.

30

**EXEMPLE 14 : Evaluation des effets sur l'obésité**

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

5

L'obésité est associée à une augmentation de la résistance à l'insuline, au diabète de type II et à une augmentation du risque cardiovasculaire et de cancer. Elle joue donc un rôle central dans plusieurs pathologies typiques des sociétés occidentales et de ce fait représente un défi pharmacologique important.

10

Les composés selon l'invention réduisent la prise de poids dans deux modèles animaux qui présentent une obésité, les souris C57BL/6 maintenues sous régime riche en graisse et le rat Zucker obèse (fa/fa). Ces propriétés sont mises en évidence de la manière suivante :

15

1) Traitement des animaux

20

Des souris C57BL/6 (Iffa Credo, L'Arbresle, France) mâles âgées de 6 semaines au début de l'expérience ont été aléatoirement rassemblées par groupes de 6 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution de leur poids corporel soit uniforme. Les souris ont reçu un régime pauvre en graisse (UAR AO4), un régime enrichi en graisse (huile de coco 29% poids/poids) ou le même régime enrichi complété avec les composés étudiés. Des rats Zucker mâles obèses (fa/fa) âgés de 5 semaines (Iffa Credo, L'Arbresle, France) rassemblés par groupes de 8 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution de taux plasmatiques de cholestérol et de triglycérides soit uniforme, sont maintenus sous régime standard complété avec les composés étudiés pendant 15 jours. Les animaux sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une température constante de  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. La prise de nourriture et la prise de poids sont enregistrées. A l'issue de l'expérience les animaux sont pesés et sacrifiés sous anesthésie. Le plasma est préparé par centrifugation à 3000 tours/minutes pendant 20 minutes.

30

Des échantillons de foie et de tissu adipeux sont prélevés, pesés et conservés congelés dans l'azote liquide pour analyses ultérieures.

2) Dosage de la leptine

- 5 La leptine, un marqueur de développement de l'obésité, est mesurée à l'aide du kit de dosage « Rat Leptin assay » de Linco Research (St Charles, MI, USA).

**EXEMPLE 15 : Evaluation des effets sur la croissance cellulaire**

10

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

Les composés selon l'invention diminuent la croissance des cellules tumorales.

15

Cette activité peut être constatée en utilisant le protocole décrit par Hvattum et al, Biochem J. 294, 917-921, 1993.

**EXEMPLE 16 : Evaluation des effets des composés sur la resténose**

20

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

- 25 La prolifération des cellules musculaires lisses est une des principales composantes de l'athérogenèse, de la resténose et de l'hypertension associées aux maladies cardiovasculaire. L'identification d'inhibiteurs de cette prolifération représente donc un défi pharmacologique intéressant.

- 30 Les composés selon l'invention diminuent la croissance des cellules musculaires lisses vasculaires *in vitro* et réduisent la resténose *in vivo* dans le modèle d'angioplastie coronarienne au ballonnet chez le rat. Ces propriétés sont mises en évidence de la manière suivante :

1) Mesures de la prolifération des cellules musculaires lisses.

Les cellules musculaires lisses d'artère coronaire ou d'aorte proviennent de  
5 Promocell (Heidelberg, Allemagne) et sont cultivées selon les indications du  
fournisseur dans un milieu de culture sélectionné pour les cellules musculaires  
lisses en présence de 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules cultivées à 50%  
de confluence sont rendues quiescentes par omission de sérum pendant 24  
heures. Les cellules sont ensuite traitées pendant 3 à 6 jours en présence de  
10 mitogènes (10% sérum, 20 ng/ml bFGF ou 2 U /ml  $\alpha$ -thrombine) et des  
composés selon l'invention. A l'issue de l'expérience, les cellules sont trypsinées  
et comptées à l'hémocytomètre.

2) Mesures de la resténose dans le modèle d'angioplastie coronarienne au  
15 ballonnet chez le rat.

Des rats Sprague-Dawley adultes de 200 à 300 g (Iffa Credo, L'Arbresle, France)  
sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une température  
constante de  $20 \pm 3^\circ\text{C}$ . Après une acclimatation d'une semaine, les rats sont  
20 pesés et rassemblés par groupes de 6 animaux sélectionnés de telle sorte que la  
distribution de leur poids corporel soit uniforme. L'artère coronaire interne  
gauche est blessée à l'aide d'un ballonnet comme décrit précédemment (Ruef et  
al., Arterioscl., Thromb. And Vasc. Biol. 20, 1745-1758, 2000). Les composés  
selon l'invention sont suspendus dans la carboxyméthylcellulose et administrés  
25 par gavage intra-gastrique, à raison d'une fois par jour pendant 4, 10 et 21 jours  
à différentes doses. Le traitement débute un jour avant l'intervention au  
ballonnet. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture. Les animaux  
sont ensuite sacrifiés et les artères coronaires sont fixées et analysées comme  
décrit précédemment (Ruef et al., Arterioscl., Thromb. And Vasc. Biol. 20, 1745-  
30 1758, 2000).

**EXEMPLE 17 : Evaluation des effets des composés sur l'hypertension**

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

5

L'hypertension artérielle est un facteur de risque important de maladies cardiovasculaires et représente un défi pharmacologique important.

Les composés selon l'invention diminuent la pression sanguine *in vivo* quand ils sont administrés à des rats spontanément hypertendus (rat SHR) utilisés comme modèle d'hypertension. Ces propriétés sont mises en évidence de la manière suivante :

1) Traitement des animaux.

15

Des rats SHR adultes de 200 à 300 g (Harlan France, Gannat, France) sont maintenus sous un cycle lumière/obscurité de 12 heures à une température constante de  $20 \pm 3^{\circ}\text{C}$ . Après une acclimatation d'une semaine, les rats sont pesés et rassemblés par groupes de 6 animaux sélectionnés de telle sorte que la distribution de leur poids corporel soit uniforme. Les composés selon l'invention sont suspendus dans la carboxyméthylcellulose et administrés par gavage intragastrique, à raison d'une fois par jour pendant 7 jours à différentes doses. Les animaux ont un accès libre à l'eau et à la nourriture.

2) Mesure de la pression sanguine.

25

La pression sanguine est mesurée selon le protocole décrit précédemment (Siragy et Carey, J. Clin. Invest., 100, 264-269, 1997)

### **EXEMPLE 18 : Evaluation des propriétés antioxydantes sur des cultures de cellules**

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est  
5 décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

#### **a) Obtention et culture des kératinocytes humains normaux**

Les cultures de kératinocytes humains normaux (KHN) sont réalisées à partir de  
10 prélèvements de peau. Le prélèvement est dans un premier temps rincé 4 fois  
dans du PBS (Phosphate Buffered Saline – Invitrogen, France). Il est ensuite  
décontaminé en le trempant dans deux bains successifs d'éthanol à 70%  
pendant 30 secondes. On découpe alors des bandelettes de 3 mm de largeur en  
prenant soin d'éliminer un maximum de tissu adipeux et de derme. Les  
15 bandelettes sont alors placées pendant 4h à 37°C dans une solution de trypsine  
à 0,25% (Invitrogen, France).

Après séparation de l'épiderme du derme, la préparation épidermique est filtrée  
et centrifugée pendant 5 minutes à 1000 tours/min.. Le culot est repris avec du  
20 milieu KHN-D (DMEM + 10% sérum de veau fœtal (SVF) + hydrocortisone 0,4  
µg/ml + EGF 10 ng/ml + toxine cholérique  $10^{-9}$ M, (Sigma, St Quentin, France)).  
Les cellules sont comptées puisensemencées à  $10 \times 10^6$  cellules/75 cm<sup>2</sup>.

Après 24h de culture, le milieu est changé, les cellules sont rincées avec du PBS  
25 et on utilise pour la suite de la culture du milieu de prolifération K-SFM  
(Invitrogen, France). Les cellules sont ensuiteensemencées à la densité voulue.  
Le milieu des cellules est changé toutes les 48h et elles sont cultivées à 37°C  
avec 5% CO<sub>2</sub>. Le traitement des cellules avec ou sans les composés selon  
l'invention est effectué avant la confluence (70-80%), les composés sont ajoutés  
30 à des concentrations variant de 1 à 100µM directement dans le milieu de culture.



### b) Obtention et culture des fibroblastes humains

Les cultures de fibroblastes humains normaux sont réalisées à partir d'un prélèvement de peau. Le prélèvement est dans un premier temps rincé 4 fois dans du PBS (Phosphate Buffered Saline - Invitrogen, France). Il est ensuite décontaminé en le trempant dans deux bains successifs d'éthanol à 70% pendant 30 secondes. Des morceaux de derme d'une surface d'environ 5mm<sup>2</sup> sont déposés au fond d'une boîte de Pétri. Une fois que les morceaux ont adhéré au support (environ 5min), ils sont recouverts de 4ml de DMEM 20 % de SVF. Le milieu est renouvelé tous les deux jours. Les cellules sortent de l'explant au bout d'une semaine et colonisent alors la boîte de Pétri. Lorsque les cellules ont colonisé le support, elles sont trypsinées, réensemencées et cultivées dans du milieu de culture DMEM 10% SVF à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> (Invitrogen, France). Le traitement des cellules est effectué à la confluence de celles-ci, les composés selon l'invention sont ajoutés à des concentrations variant de 1 à 100 µM directement dans le milieu de culture.

### c) Mesure des ARN messagers

Les ARNm ont été extraits des kératinocytes et des fibroblastes humains normaux en culture traités ou non avec les composés selon l'invention. L'extraction est réalisée à l'aide des réactifs du kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep Kit (Stratagene, France) selon les indications du fournisseur. Les ARNm sont ensuite dosés par spectrométrie et quantifiés par RT-PCR quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast start DNA Master Sybr Green I kit (Roche) sur un appareil Light Cycler System (Roche, France). Des paires d'amorces spécifiques des gènes de la Super Oxyde Dismutase (SOD) et de la Glutathion Peroxydase (GPx), enzymes anti-oxydantes, ont été utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes 36B4, β-actine et GAPDH ont été utilisées comme sondes témoins (Cf. tableau I).

#### d) Mesure de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

L'activité de la Glutathion peroxydase est déterminée à partir d'extraits protéiques de cellules (kératinocytes, fibroblastes) traitées ou non avec les composés selon l'invention à des concentrations variant de 1 à 100µM. La mesure de l'activité de la GPx est également réalisée dans des conditions stressantes pour les cellules, 0,5 mM paraquat ou 0,6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (inducteurs des espèces oxygénées réactives). La mesure de l'activité des extraits protéiques se fait à l'aide du kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (Sigma) selon les indications du fournisseur. La mesure indirecte est basée sur l'oxydation du glutathion en glutathion oxydé catalysé par la glutathion peroxydase. Le retour à la forme non oxydée est catalysé par la glutathion réductase et le NADPH (β-nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate). La diminution de l'absorbance du NADPH est mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre Shimadzu 1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) et reflète l'activité de la GPx, puisque la GPx est le facteur limitant de cette réaction.

#### e) Mesure de la peroxydation lipidique

20

Les réactifs proviennent de chez Sigma (St Quentin, France) sauf lorsque mentionné autrement.

La peroxydation lipidique est mesurée par dosage du malondialdéhyde (MDA) par l'acide thiobarbiturique (TBA). Après les traitements, le surnageant des cellules est collecté (900 µl) et 90 µl d'hydroxytoluène butylé y sont ajoutés (Morliere P. et al. (1991). UVA-induced lipid peroxidation in cultured human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1084, 261-8.). Un ml d'une solution de TBA à 0,375% dans 0,25M HCl contenant 15% d'acide trichloroacétique est également ajouté au surnageant. Le mélange est chauffé à 80°C pendant 15 min, refroidi sur glace et la phase organique est extraite avec du butanol. L'analyse de la phase organique se fait par spectrofluorométrie ( $\lambda_{exc}$  = 515 nm et  $\lambda_{em}$  = 550 nm),

en utilisant un spectrofluorimètre Shimazu 1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon). Les TBARS sont exprimés en équivalents MDA en utilisant comme standard le tétra-éthoxypropane. Les résultats sont normalisés par rapport au contenu en protéines des cellules. L'induction de la peroxydation lipidique est obtenue en traitant les cellules avec du paraquat 0,5 mM (inducteur des espèces oxygénées réactives) ou avec du peroxyde d'hydrogène 0,6 mM pendant 4h. La protection anti-radicalaire des composés selon l'invention à des concentrations variant de 1 à 100  $\mu$ M est évaluée par un pré-traitement de 24h, avant l'induction de la peroxydation lipidique.

10

**EXEMPLE 19 : Evaluation des propriétés anti-inflammatoires sur des épidermes reconstruits**

Les épidermes reconstruits sont fournis par la société SkinEthic (Nice, France).

15 Les épidermes sont utilisés à j 17 (0,63  $\text{cm}^2$ ) lorsque la couche cornée est présente et que l'ultra structure de l'épithélium se rapproche de celle de l'épiderme humain *in vivo*. Les épidermes reconstruits sont maintenus en culture selon les indications du fournisseur. Les doses de composés selon l'invention employées pour le traitement des épidermes reconstruits varient entre 2 et 10 mg/ $\text{cm}^2$  pendant 24 et 72h.

20

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

25 **a) Mesure des propriétés anti-inflammatoires**

Les épidermes reconstruits sont préincubés avec les composés selon l'invention à des concentrations variant de 2 à 10 mg/ $\text{cm}^2$  pendant 24h, puis traités pendant 6h avec du SDS 0,4% ou 1 $\mu$ g de TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate).

30 Le potentiel anti-inflammatoire des composés est évalué à l'aide de la technique ELISA. Les milieux de culture (sous-jacents) des épidermes contrôles ou traités sont collectés et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . La quantification de l'interleukine 1- $\alpha$  (IL1- $\alpha$ )

est réalisée à l'aide du kit de détection ELISA IL1- $\alpha$  Kit (R&D system, UK) selon les indications du fournisseur.

#### b) Mesure des ARN messagers

5

Les ARNm ont été extraits des épidermes reconstruits traités avec ou sans les composés selon l'invention dans les mêmes conditions que précédemment. L'extraction est réalisée à l'aide des réactifs du kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep Kit (Stratagene) selon les indications du fournisseur, les ARNm sont ensuite dosés par spectrométrie et quantifiés par RT-PCR quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast start DNA Master Sybr Green I kit (Roche) sur un appareil Light Cycler System (Roche). Des paires d'amorces spécifiques des gènes IL1 (interleukine 1) et IL6, ont été utilisées comme sondes. Des paires d'amorces spécifiques des gènes 36B4,  $\beta$ -actine et GAPDH ont été utilisées comme sondes témoins (Cf. tableau I).

15

#### **EXEMPLE 20 : Evaluation des propriétés anti-oxydantes sur des épidermes reconstruits**

Les épidermes reconstruits sont fournis par la société SkinEthic (Nice, France). Les épidermes sont utilisés à j 17 (0,63 cm<sup>2</sup>) lorsque la couche cornée est présente et que l'ultra structure de l'épithélium se rapproche de celle de l'épiderme humain *in vivo*. Les épidermes reconstruits sont maintenus en culture selon les indications du fournisseur. Les doses de composés selon l'invention employées pour le traitement des épidermes reconstruits varient entre 2 et 10 mg/cm<sup>2</sup> pendant 24 et 72h.

25

Les composés selon l'invention testés sont les composés dont la préparation est décrite dans les exemples 2 à 5 ci-dessus.

30

#### a) Mesure des ARN messagers

Les ARNm ont été extraits des kératinocytes (provenant des épidermes reconstruits traités avec ou sans les composés selon l'invention). L'extraction est réalisée à l'aide des réactifs du kit Absolutely RNA RT-PCR miniprep Kit (Stratagene) selon les indications du fournisseur, les ARNm sont ensuite dosés  
5 par spectrométrie et quantifiés par RT-PCR quantitative à l'aide du kit Light Cycler Fast start DNA Master Sybr Green I kit (Roche) sur un appareil Light Cycler System (Roche). Des paires d'amorces spécifiques des gènes de la Super Oxyde Dismutase (SOD) et de la Glutathion Peroxydase (GPx), enzymes anti-oxydantes, ont été utilisées comme sondes. Des paires d'amorces  
10 spécifiques des gènes 36B4,  $\beta$ -actine et GAPDH ont été utilisées comme sondes témoins (Cf. tableau I).

b) Mesure de l'activité de la glutathion peroxydase (GPx)

15 L'activité de la Glutathion peroxydase est déterminée à partir d'extraits protéiques d'épidermes reconstruits traités ou non avec les composés selon l'invention (2 à 10 mg/cm<sup>2</sup>). La mesure de l'activité de la GPx est également réalisée dans des conditions stressantes pour les cellules, 0,5 mM paraquat (inducteur des espèces oxygénées réactives). La mesure de l'activité des extraits  
20 protéiques se fait à l'aide du kit Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (Sigma) selon les indications du fournisseur. La mesure indirecte est basée sur l'oxydation du glutathion en glutathion oxydé catalysée par la glutathion peroxydase. Le retour à la forme non oxydée est catalysé par la glutathion réductase et le NADPH ( $\beta$ -nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate). La  
25 diminution de l'absorbance du NADPH est mesurée à 340 nm à l'aide d'un spectrofluorimètre Shimazu 1501 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japon) et reflète l'activité de la GPx, puisque la GPx est le facteur limitant de cette réaction.

**EXEMPLE 21 : Composition cosmétique : crème de jour pour le visage, anti-âge**

Glycéryl stéarate + PEG-100 stéarate	6,00 %
Squalane	3,00 %
Polyisobutène hydrogéné	3,00 %
Tricaprylate/caprate de glycérol	3,00 %
Glycérine	2,00 %
Méthoxycinnamate d'octyl	2,00 %
Cire d'abeille	1,50 %
Octanoate de cétostéaryl	1,50 %
Alcool cétylique	1,00 %
Alcool stéarylique	1,00 %
Diméthicone	1,00 %
Gomme Xanthane	0,20 %
Carbomer	0,15 %
1,2,3-tritétradécylthioacétylglycérol	0,10 %
Neutralisant	qs.
Conservateurs	qs.
Parfum, Colorants	qs.
Eau	qsp 100,00 %

5

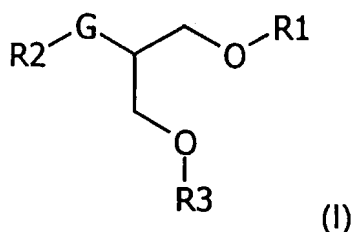
**EXEMPLE 22 : Composition cosmétique : émulsion-gel pour le visage, anti-rides**

Glycérine	5,00 %
Caprylic/capric/Succinic triglycérides	3,00 %
Méthoxycinnamate d'octyl	1,00 %
1,3-dipalmitoyl-2-tétradécylthioacétylglycérol	0,50 %
Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,50 %
Hydrolysate de protéine de blé	0,50 %
Diméthicone copolyol	0,50 %
Neutralisant	qs.
Conservateurs	qs.
Parfum, Colorants	qs.
Eau	qsp 100,00 %

**REVENDICATIONS**

1. Composé de formule générale (I) :

5



dans laquelle

10

- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,

15

- R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent (i) un atome d'hydrogène, (ii) un groupe CO-R dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe  $\text{SO}_2$ , n est un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou 1, et R' est un

20 groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 13 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe(s) choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO et un groupe  $\text{SO}_2$ , l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe

25 de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  tel que défini ci-dessus.

2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ou les groupes R, identiques ou différents, représentent un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, substitué ou non, dont la chaîne principale

comporte de 1 à 20 atomes de carbone, de préférence de 7 à 17 atomes de carbone.

3. Composé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le ou les groupes R', identiques ou différents, représentent un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou insaturé, substitué ou non, dont la chaîne principale comporte de 13 à 20 atomes de carbone, plus préférentiellement de 14 à 17 atomes de carbone.
4. Composé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que le ou les groupes R, identiques ou différents, sont choisis parmi  $C_7H_{15}$ ,  $C_{10}H_{21}$ ,  $C_{11}H_{23}$ ,  $C_{13}H_{27}$ ,  $C_{14}H_{29}$ ,  $C_{16}H_{33}$ ,  $C_{17}H_{35}$ ,  $C_{15}H_{31}$ ,  $C_{20:5}(5, 8, 11, 14, 17)$ ,  $C_{22:6}(4, 7, 10, 13, 16, 19)$ ,  $C_{14}H_{27}$ ,  $C_{14}H_{25}$ ,  $C_{15}H_{29}$ ,  $C_{17}H_{29}$ ,  $C_{17}H_{31}$ ,  $C_{17}H_{33}$ ,  $C_{19}H_{29}$ ,  $C_{19}H_{31}$ ,  $C_{21}H_{31}$ ,  $C_{21}H_{35}$ ,  $C_{21}H_{37}$ ,  $C_{21}H_{39}$ ,  $C_{23}H_{45}$ ,  $(CH_2)_n-CH(CH_3)C_2H_5$ ,  $(CH=C(CH_3)(CH_2)_2)_{n''}-CH=C(CH_3)_2$  et  $(CH_2)_{2x+1}-C(CH_3)_2-(CH_2)_{n'''}-CH_3$ , x étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 11, n' étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 22, n'' étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 5, n''' étant un nombre entier égal à ou compris entre 0 et 22, et  $(2x+n''')$  étant inférieur ou égal à 22.
5. Composé selon la revendication 1 ou 3, caractérisé en ce que le ou les groupes R', identiques ou différents, sont choisis parmi  $C_{13}H_{27}$ ,  $C_{14}H_{29}$ ,  $C_{16}H_{33}$ ,  $C_{17}H_{35}$ ,  $C_{15}H_{31}$ ,  $C_{20:5}(5, 8, 11, 14, 17)$ ,  $C_{22:6}(4, 7, 10, 13, 16, 19)$ ,  $C_{14}H_{27}$ ,  $C_{14}H_{25}$ ,  $C_{15}H_{29}$ ,  $C_{17}H_{29}$ ,  $C_{17}H_{31}$ ,  $C_{17}H_{33}$ ,  $C_{19}H_{29}$ ,  $C_{19}H_{31}$ ,  $C_{21}H_{31}$ ,  $C_{21}H_{35}$ ,  $C_{21}H_{37}$ ,  $C_{21}H_{39}$ ,  $C_{23}H_{45}$ ,  $(CH_2)_n-CH(CH_3)C_2H_5$ ,  $(CH=C(CH_3)(CH_2)_2)_{n''}-CH=C(CH_3)_2$  et  $(CH_2)_{2x+1}-C(CH_3)_2-(CH_2)_{n'''}-CH_3$ , x étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 11, n' étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 22, n'' étant un nombre entier égal à ou compris entre 1 et 5, n''' étant un nombre entier égal à ou compris entre 0 et 22, et  $(2x+n''')$  étant inférieur ou égal à 20.



6. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le ou les groupes R, identiques ou différents, représentent un groupe alkyle inférieur comportant de 1 à 6 atomes de carbone.
- 5 7. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le ou les groupes R', identiques ou différents, sont des groupes alkyle saturés et linéaires comportant de 13 à 17 atomes de carbone, de préférence de 14 à 16, plus préférentiellement 14.
- 10 8. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les groupes alkyle sont substitués par un ou plusieurs substituants, identiques ou différents choisis parmi un atome d'halogène (iode, chlore, fluor, brome) et un groupe OH, =O, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, CN, CH<sub>2</sub>-O, CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub> et COOZ dans lequel Z est un atome  
15 d'hydrogène ou un groupe alkyle comportant de 1 à 6 atomes de carbone.
9. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que X est un atome de soufre ou de sélénium, de préférence un atome de soufre.
- 20 10. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le groupe G représente un atome d'oxygène ou un groupe N-R<sub>4</sub> et, lorsque G est N-R<sub>4</sub>, R<sub>4</sub> représente préférentiellement un atome d'hydrogène ou un groupe méthyle.
- 25 11. Composé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que dans le groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R', n est différent de 1 et est en particulier égal à 0.
- 30 12. Composé de formule (I) selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle au moins un des groupes R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub> représente un groupe CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' dans lequel X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle

saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, de préférence de 14 à 16, encore plus préférentiellement 14 atomes de carbone.

- 5 13. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que R2 est un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , de préférence dans laquelle X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, plus préférentiellement dans lesquels n est égal à 0, en particulier un groupe de formule  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-$
- 10  $\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ .
14. Composé selon la revendication 13, caractérisé en ce que R1 et R3, identiques ou différents, représentent un atome d'hydrogène ou un groupe CO-R.
- 15 15. Composé selon la revendication 14, caractérisé en ce que R1 et R3, identiques ou différents, représentent un groupe CO-R.
- 20 16. Composé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que deux des groupes R1, R2 et R3 sont des groupes  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , identiques ou différents, de préférence dans lesquels X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, plus préférentiellement dans lesquels n est égal à 0, en particulier des groupes
- 25  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ .
- 30 17. Composé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que R1, R2 et R3, identiques ou différents, de préférence identiques, sont des groupes  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , de préférence dans lesquels X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, plus préférentiellement dans lesquels n est égal à 0, et en particulier des groupes  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ .

18. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que R1 est un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$ , de préférence dans laquelle X représente un atome de sélénium ou de préférence de soufre et/ou R' est un groupe alkyle saturé et linéaire comprenant de 13 à 17 atomes de carbone, plus préférentiellement dans laquelle n est égal à 0 et en particulier un groupe  $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_{14}\text{H}_{29}$ .
19. Composé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'un et/ou les deux groupes R2 et R3 représentent un atome d'hydrogène.
20. Composé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'un et/ou les deux groupes R2 et R3 représentent un groupe  $\text{CO}-\text{R}$ , identique ou non.
21. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 et 18 à 20, caractérisé en ce que l'un des substituants R1, R2 ou R3 est un groupe  $\text{COCH}_3$ .
22. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend, dans un véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique, au moins un composé de formule générale (I) telle que décrite dans la revendication 1, dans laquelle
- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe  $\text{N}-\text{R}_4$  dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,
  - R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent (i) un atome d'hydrogène, (ii) un groupe  $\text{CO}-\text{R}$  dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe  $\text{SO}_2$ , n est un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou

- 1 et encore plus préférentiellement à 0, et R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 2 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' tel que défini ci-dessus.
23. Composition cosmétique caractérisée en ce qu'elle comprend, dans un véhicule acceptable sur le plan cosmétique au moins un composé de formule générale (I) telle que décrite dans la revendication 1, dans laquelle
- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,
  - R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent (i) un atome d'hydrogène, (ii) un groupe CO-R dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un groupe de formule CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, n est un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou 1 et encore plus préférentiellement à 0, et R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 2 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' tel que défini ci-dessus.

24. Composition selon la revendication 22 ou 23, caractérisée en ce que le composé est de formule (I) dans laquelle R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 9 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe.
25. Composition selon l'une des revendications 22 à 24, caractérisée en ce que le composé de formule (I) est tel que défini à l'une des revendications 1 à 21.
26. Utilisation d'un composé de formule générale (I) telle que définie à la revendication 1 pour la préparation d'une composition pharmaceutique pour la prévention et/ou le traitement de dyslipidémies, de maladies cardiovasculaires, du syndrome X, de la resténose, du diabète, de l'obésité, de l'hypertension, de cancers ou de maladies dermatologiques, le composé étant de formule (I) dans laquelle :
- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R<sub>4</sub> dans lequel R<sub>4</sub> est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,
  - R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> et R<sub>3</sub>, identiques ou différents, représentent (i) un atome d'hydrogène, (ii) un groupe CO-R dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un groupe de formule CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, n est un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou 1 et encore plus préférentiellement à 0, et R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 2 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un

groupe  $\text{SO}_2$ , l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  tel que défini ci-dessus.

27. Utilisation d'un composé de formule générale (I) telle que définie à la  
5 revendication 1 pour la préparation d'une composition cosmétique pour la prévention et/ou le traitement du vieillissement cutané et de ses effets, de la protection de la peau, de l'apparition ou du développement des rides, le composé étant de formule générale (I) dans laquelle :
- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe  
10 N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,
  - R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent (i) un atome  
15 d'hydrogène, (ii) un groupe CO-R dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe  $\text{SO}_2$ , n est  
20 un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou 1 et encore plus préférentiellement à 0, et R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 2 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou  
25 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe  $\text{SO}_2$ , l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  tel que défini ci-dessus.
28. Utilisation d'un composé de formule générale (I) telle que définie dans la  
30 revendication 1, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à diminuer les taux de triglycérides et/ou de cholestérol circulants ou à inhiber la modification oxydative des LDL, le composé étant de formule (I) dans laquelle :

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,
  - R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent (i) un atome d'hydrogène, (ii) un groupe CO-R dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, n est un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou 1 et encore plus préférentiellement à 0, et R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 2 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  tel que défini ci-dessus.
29. Utilisation d'un composé de formule générale (I) telle que définie à la revendication 1, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à induire l'expression d'enzymes impliquées dans la  $\beta$ -oxydation mitochondriale et peroxysomale et/ou à augmenter les capacités d'oxydation des acides gras hépatiques et/ou à induire la croissance des mitochondries dans les fibres musculaires de type I et II et/ou à activer PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , le composé étant de formule générale (I) dans laquelle :
- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,

- R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent (i) un atome d'hydrogène, (ii) un groupe CO-R dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe  $\text{SO}_2$ , n est un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou 1 et encore plus préférentiellement à 0, et R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 2 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe  $\text{SO}_2$ , l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  tel que défini ci-dessus.
30. Utilisation d'un composé de formule générale (I) telle que définie dans la revendication 1, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à diminuer la croissance des cellules tumorales, le composé étant de formule générale (I) dans laquelle :
- G représente un atome d'oxygène, un atome de soufre ou un groupe N-R4 dans lequel R4 est un atome d'hydrogène ou un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, comportant de 1 à 5 atomes de carbone,
- R1, R2 et R3, identiques ou différents, représentent (i) un atome d'hydrogène, (ii) un groupe CO-R dans lequel R est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 1 à 25 atomes de carbone, ou (iii) un groupe de formule  $\text{CO}-(\text{CH}_2)_{2n+1}-\text{X}-\text{R}'$  dans lequel X est un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe  $\text{SO}_2$ , n est un nombre entier compris entre 0 et 11, préférentiellement égal à 0 ou 1 et encore plus préférentiellement à 0, et R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la



chaîne principale comporte de 2 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe, de préférence 0, 1 ou 2, plus préférentiellement 0 ou 1, choisis parmi un atome d'oxygène, un atome de soufre, un atome de sélénium, un groupe SO ou un groupe SO<sub>2</sub>, l'un au moins des groupes R1, R2 et R3 étant un groupe de formule CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2n+1</sub>-X-R' tel que défini ci-dessus.

31. Utilisation selon l'une des revendications 26 à 30, caractérisée en ce que le composé est de formule (I) dans laquelle R' est un groupe alkyle linéaire ou ramifié, saturé ou non, éventuellement substitué, dont la chaîne principale comporte de 9 à 23 atomes de carbone et éventuellement un ou plusieurs hétérogroupe.
32. Utilisation selon l'une des revendications 26 à 31, caractérisée en ce que le composé de formule (I) est tel que défini à l'une des revendications 1 à 21.

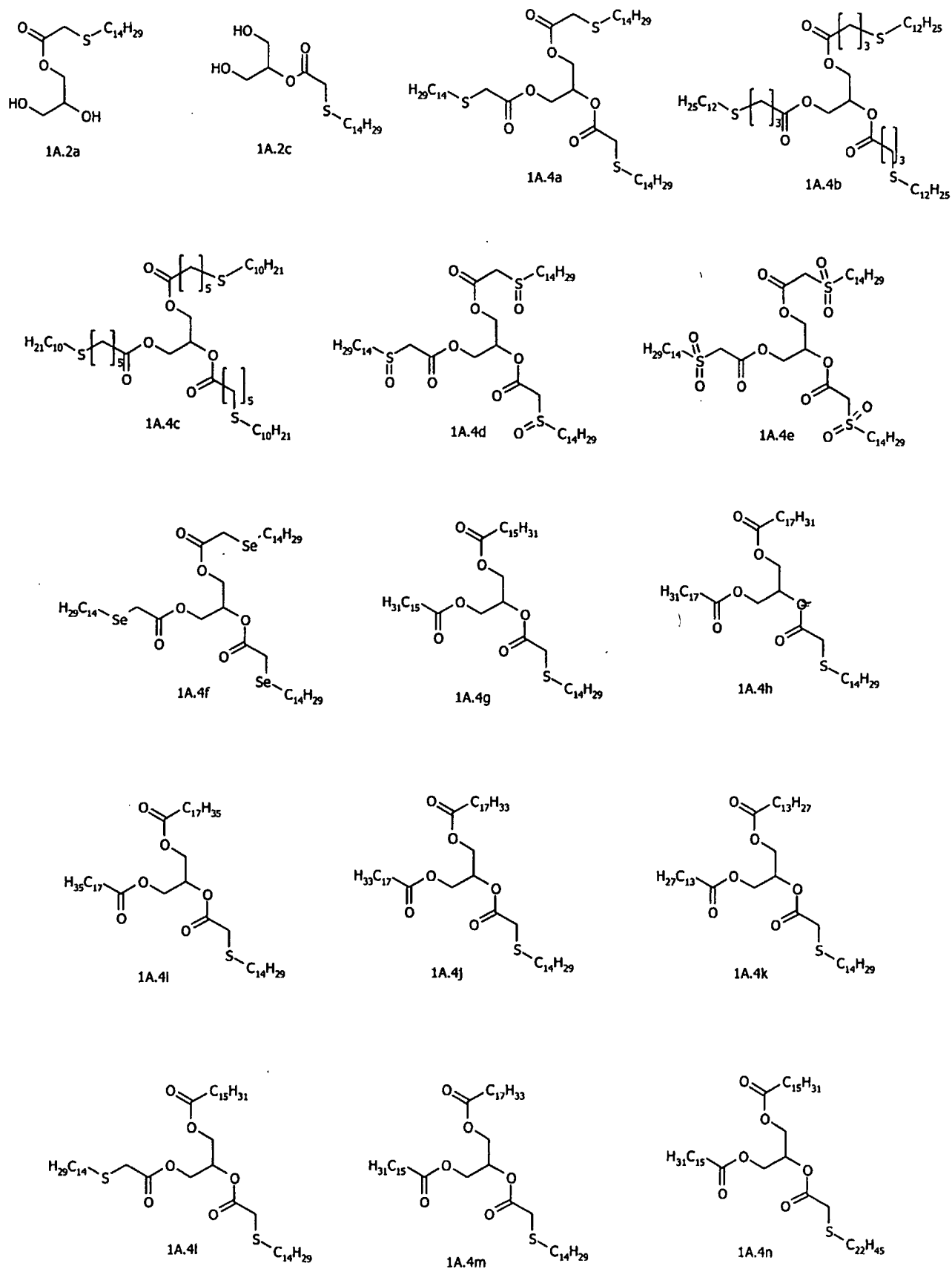


Figure 1A

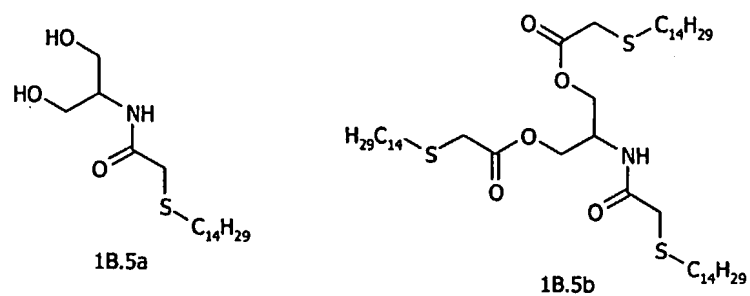


Figure 1B

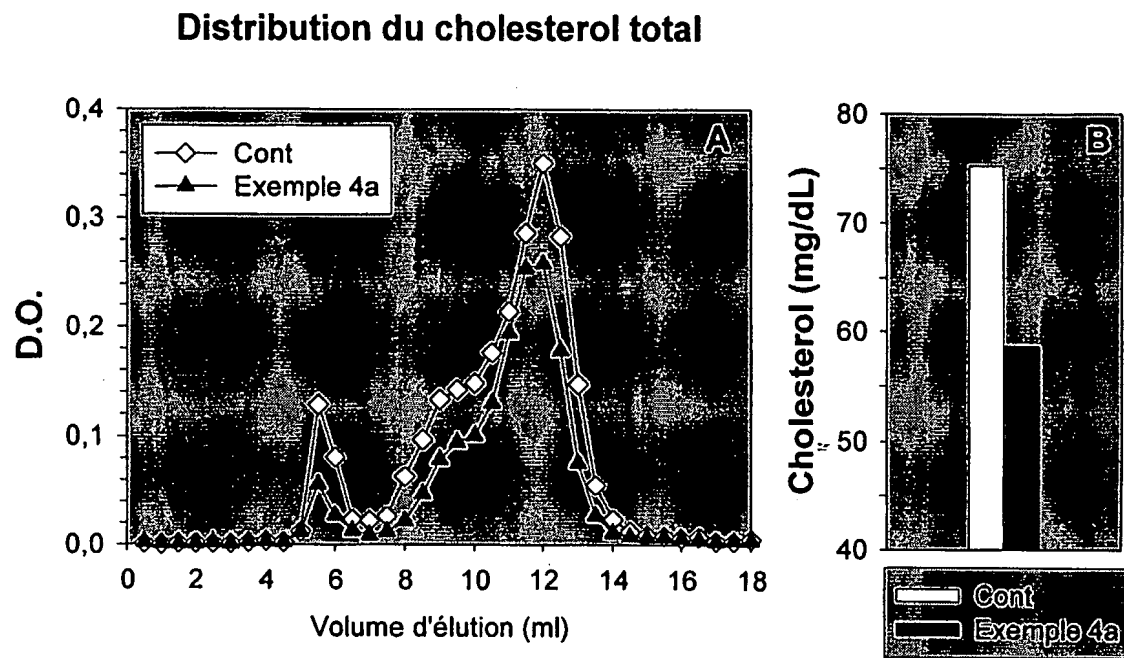


Figure 2

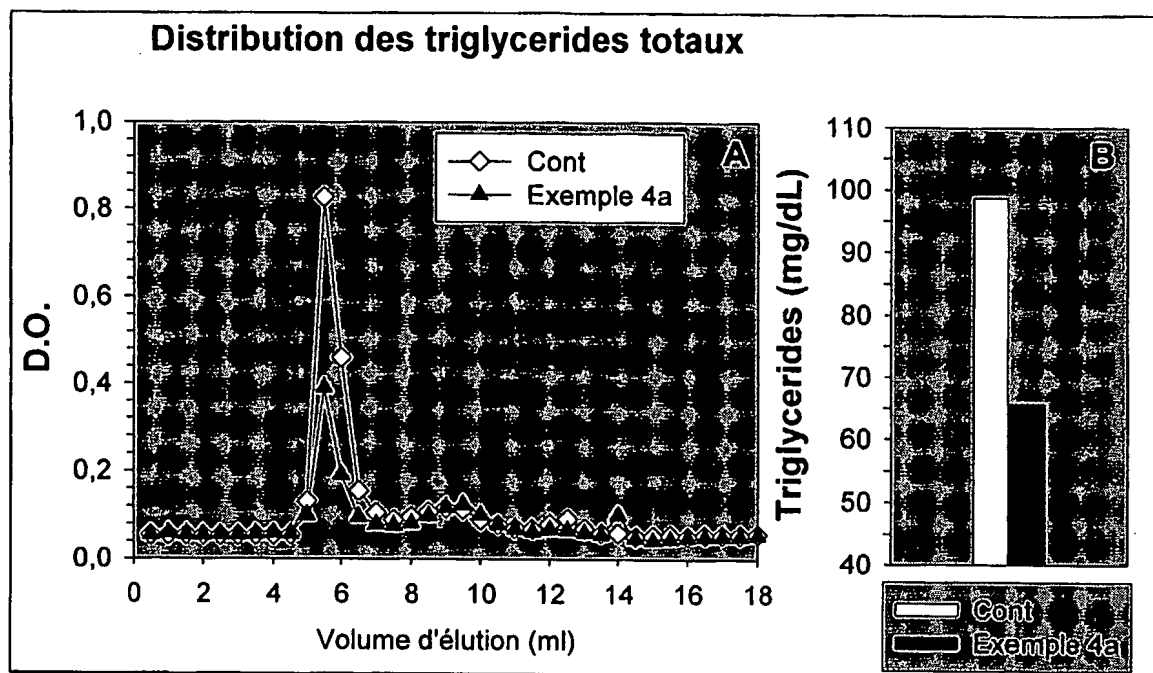


Figure 3

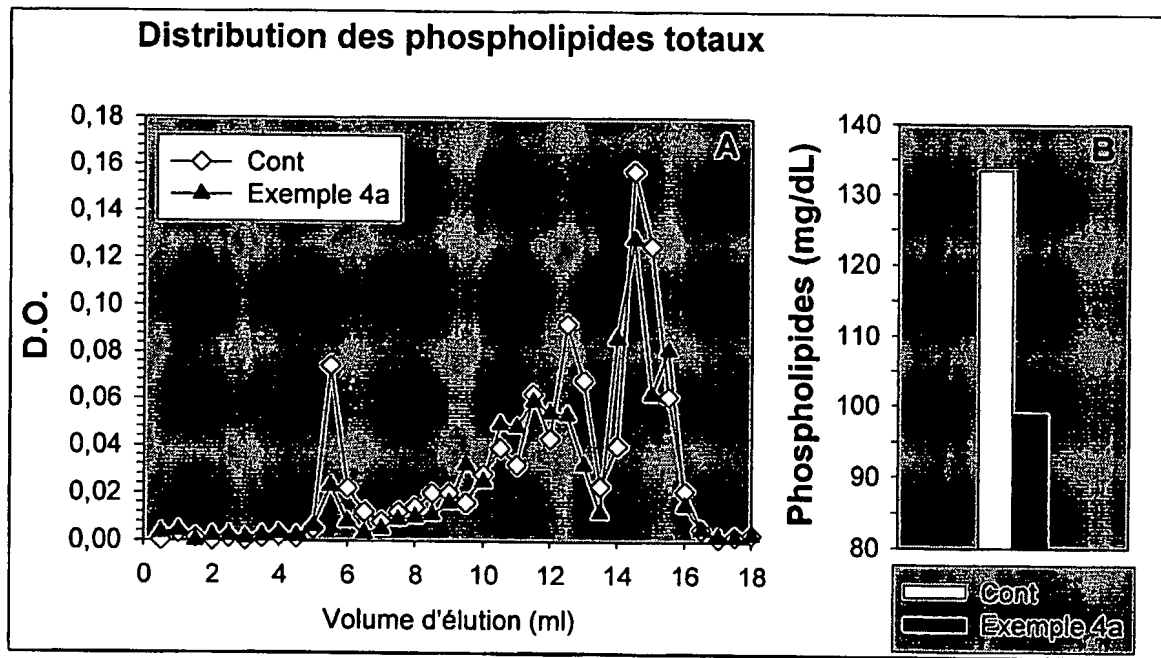


Figure 4

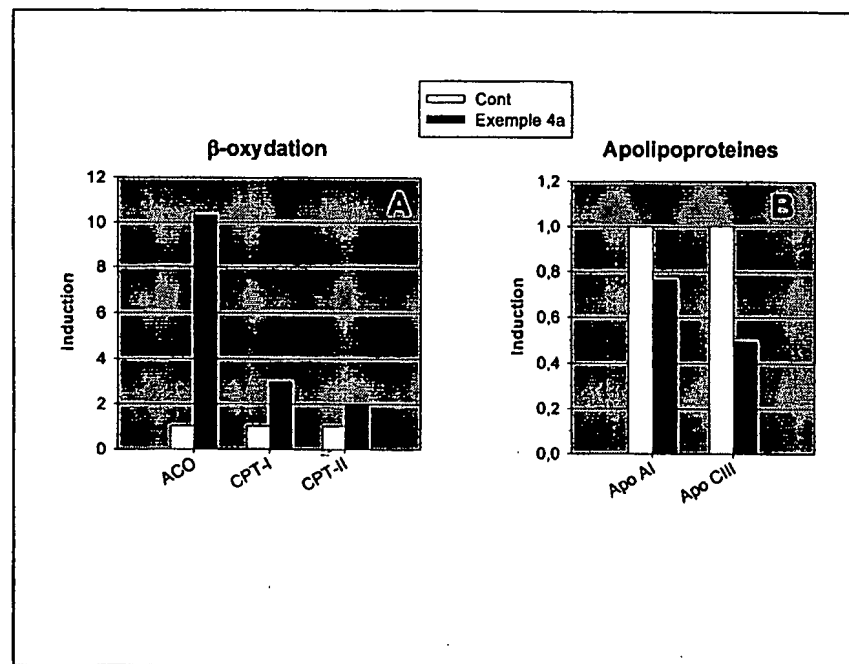


Figure 5

7/13

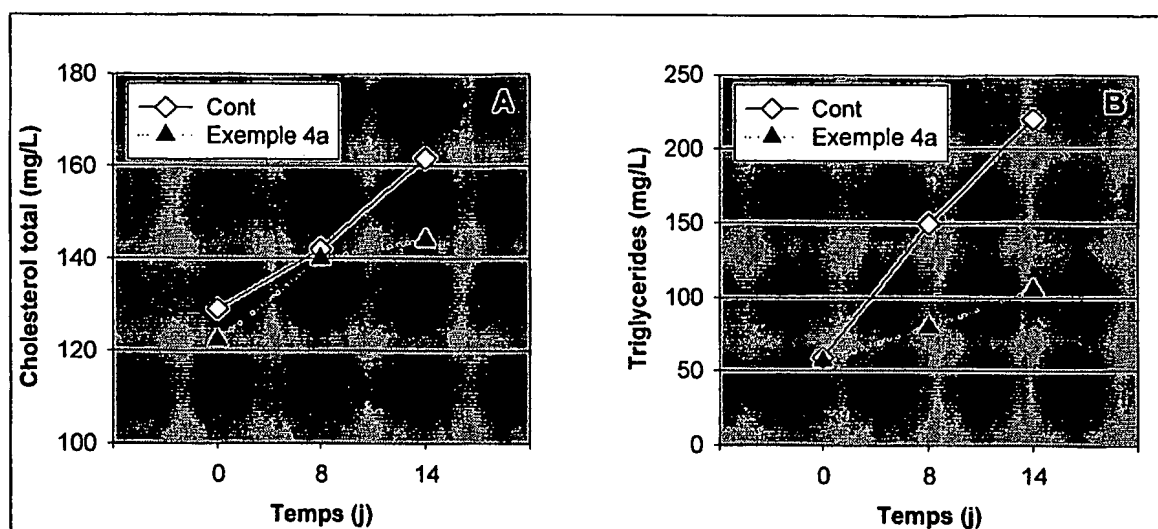


Figure 6



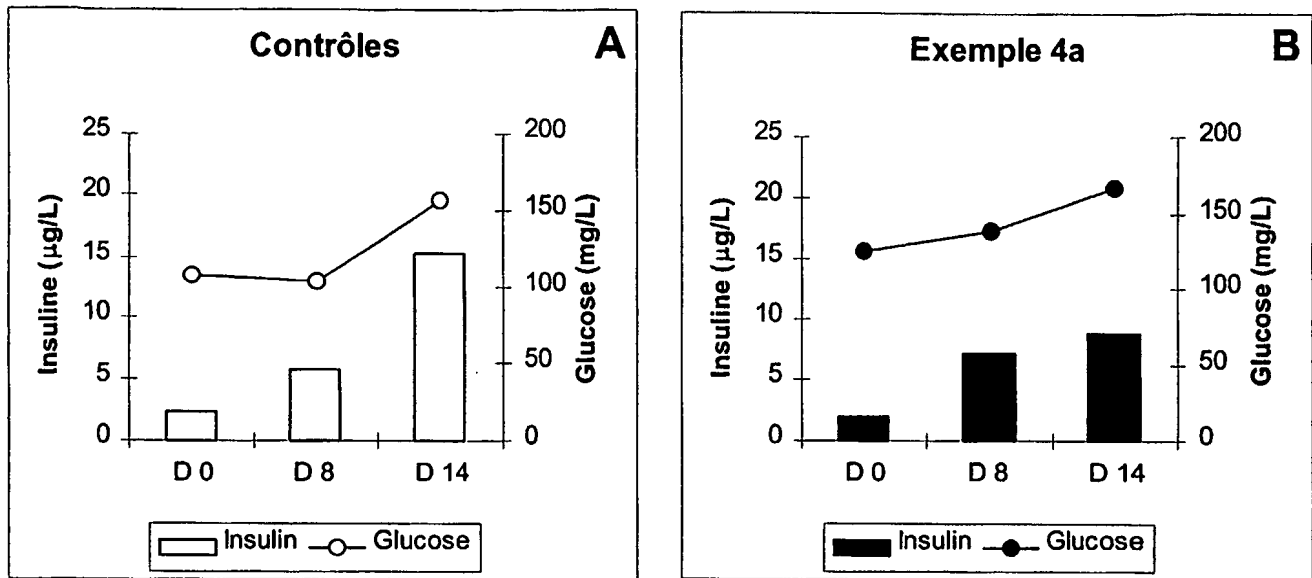


Figure 7

9/13

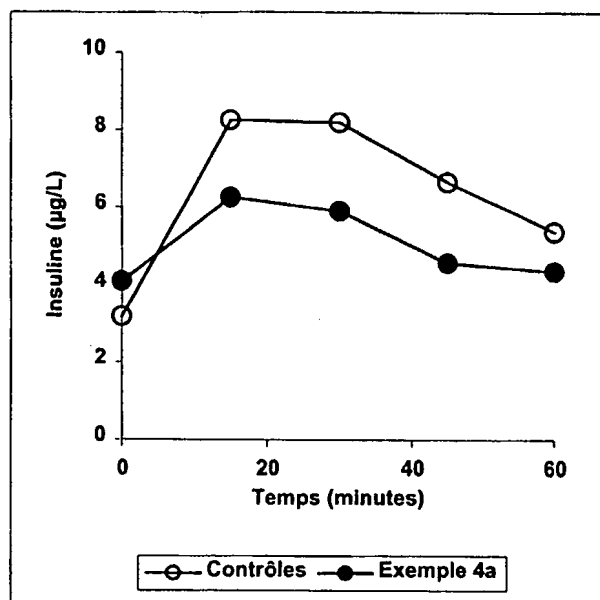


Figure 8

10/13

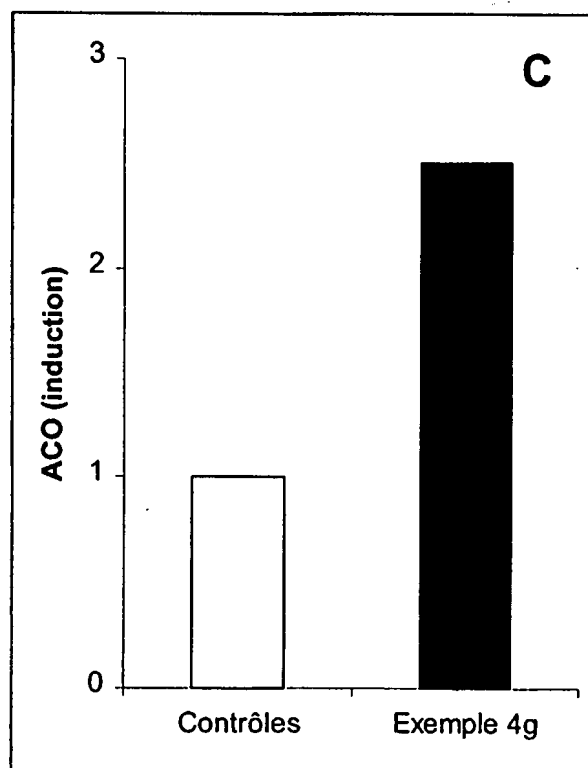
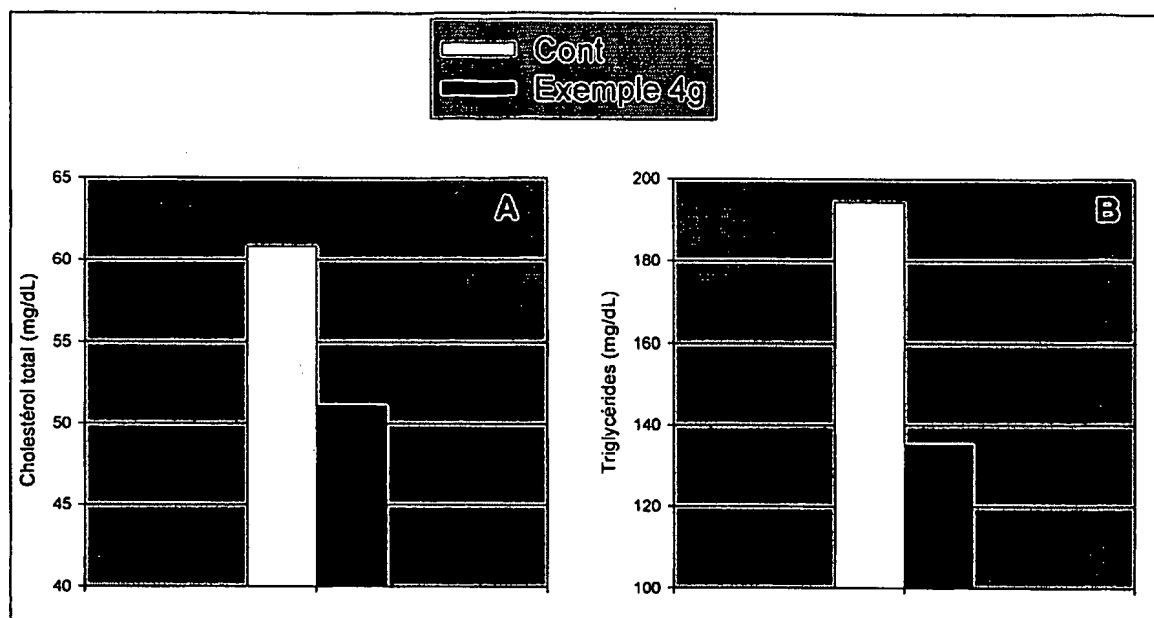


Figure 9

11/13

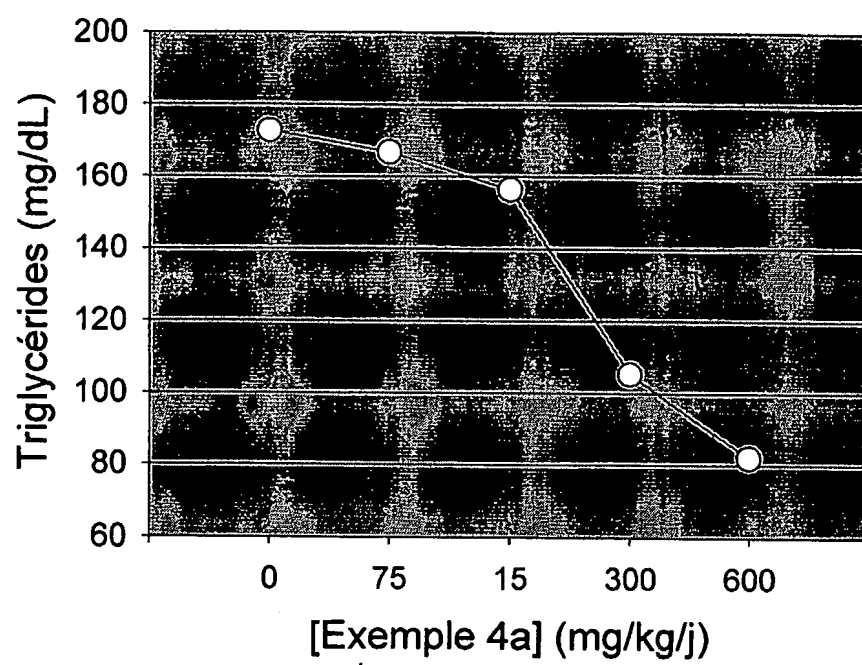


Figure 10

12/13

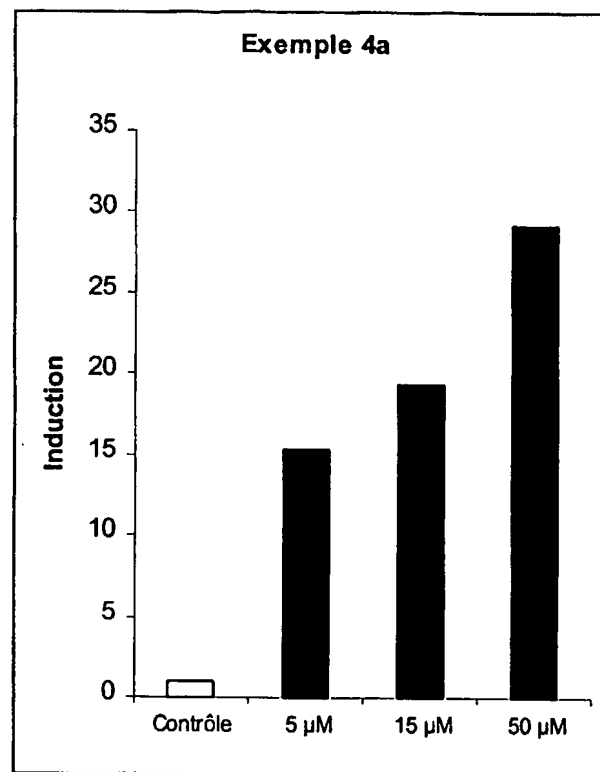


Figure 11

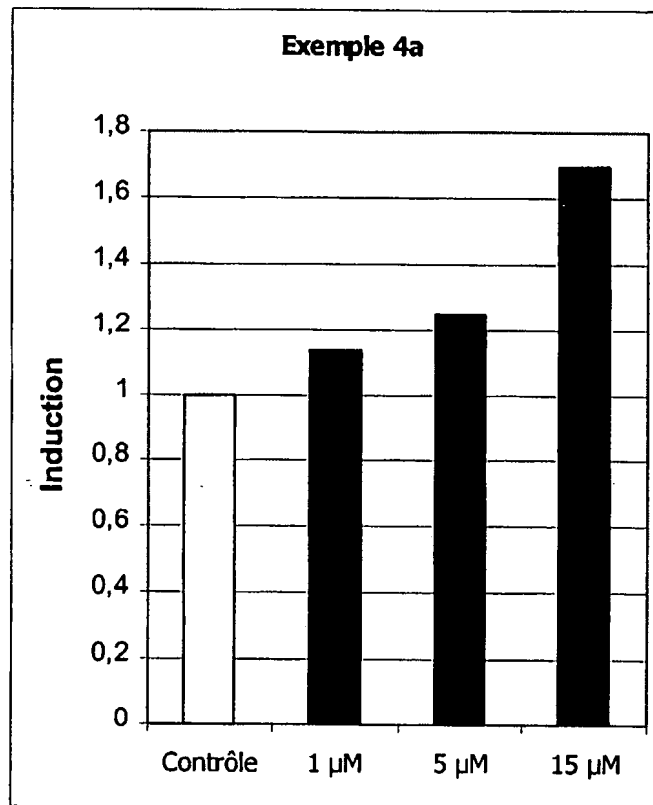


Figure 12

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C323/52 A61K31/22 A61K31/23

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07C A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DE 20 28 240 A (MITSUBISHI PETROCHEMICAL CO LTD) 23 December 1970 (1970-12-23) * page 19, exemple 3; page 20, exemple 4 *	1,3,9,10
X	--- DATABASE CAPLUS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; retrieved from STN Database accession no. 1983:18071 XP002203065 * abrégé; RN 83995-03-3 * & JP 57 082573 A (MATSUMO YUSHI-SEIYAKU CO LTD) 24 May 1982 (1982-05-24)	1,3,9,10
A	--- L.P. MOLLEYRES ET AL: J. BIOL. CHEM., vol. 263, no. 29, 1988, pages 14832-14838, XP001042275 * page 14835, composés 7-10, 12-16 * --- -/--	1,26,28

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* &amp; \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 January 2003

Date of mailing of the international search report

31/01/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Amsterdam, L

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 018 342 A (OMNIUM FINANCIER AQUITAINE POUR L'HYGIENE ET LA SANTE) 29 October 1980 (1980-10-29) * page 4, lignes 14, 28-30; page 5, lignes 6-19; page 16, ligne 29 - page 17, ligne 15; page 34, ligne 34; page 48, lignes 18-19 *	1,22
A	--- K. LARSSON: ACTA CRYSTALLOGR., vol. 16, 1963, pages 741-748, XP000926795 the whole document	1
A	--- R. LI ET AL: J. ORG. CHEM., vol. 58, no. 7, 1993, pages 1952-1954, XP002203063 * page 1952, schéma 1, composés 7-10 *	1
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 51, no. 13, 10 July 1957 (1957-07-10) Columbus, Ohio, US; abstract no. 9489f, XP002203064 abstract & L.C.F. BLACKWELL ET AL: J. CHEM. SOC., 1957, pages 165-169,	1
A	--- DATABASE CAPLUS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; retrieved from STN Database accession no. 1976:151548 XP002203066 * abrégé; RN 58888-36-1, 58888-37-2 * & JP 50 160358 A (ADEKA ARGUS CHEMICAL CO LTD) 25 December 1975 (1975-12-25)	1
A	--- T. NAALSUND ET AL: CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS, vol. 112, no. 1, 2001, pages 59-65, XP000926796 * page 61, composé 6 *	1
A	--- US 2 010 154 A (M.H. HUBACHER) 6 August 1935 (1935-08-06) * page 3, ester I; page 4, ester II; page 5, ester IX *	1
A	--- U. HEIMANN ET AL: LIEBIGS ANN. CHEM., vol. 6, 1980, pages 858-862, XP001042276 * page 858, composés 1-8 *	1
A	--- EP 0 447 553 A (KAO CORP) 25 September 1991 (1991-09-25) * page 15, ligne 6 *	1

-/--



## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 134 770 A (K. EMOTO ET AL) 16 January 1979 (1979-01-16) * colonne 6, exemple 4 * -----	1

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
DE 2028240	A	23-12-1970	JP	49046144 B	07-12-1974
			JP	49046145 B	07-12-1974
			JP	49023295 B	14-06-1974
			DE	2028240 A1	23-12-1970
			GB	1271179 A	19-04-1972
			US	3629194 A	21-12-1971
<hr/>					
JP 57082573	A	24-05-1982	JP	1430896 C	24-03-1988
			JP	61053473 B	18-11-1986
<hr/>					
EP 18342	A	29-10-1980	AR	224394 A1	30-11-1981
			AT	2509 T	15-03-1983
			AU	534007 B2	22-12-1983
			AU	5587280 A	11-09-1980
			CA	1162928 A1	28-02-1984
			CA	1164012 A2	20-03-1984
			CS	216526 B2	26-11-1982
			CY	1209 A	31-12-1983
			DD	151931 A5	11-11-1981
			DD	158773 A5	02-02-1983
			DE	3061960 D1	24-03-1983
			DK	93880 A	07-09-1980
			EP	0018342 A1	29-10-1980
			ES	8103015 A1	16-05-1981
			FI	800683 A ,B,	07-09-1980
			GR	70703 A1	04-01-1983
			HK	22384 A	23-03-1984
			HU	188840 B	28-05-1986
			HU	183072 B	28-04-1984
			IE	49539 B1	30-10-1985
			IL	59407 A	30-12-1983
			IN	152492 A1	28-01-1984
			JP	1470380 C	14-12-1988
			JP	55141436 A	05-11-1980
			JP	63015256 B	04-04-1988
			KE	3476 A	16-11-1984
			MX	6824 E	08-08-1986
			MY	7585 A	31-12-1985
			NO	800626 A ,B,	08-09-1980
			NZ	192944 A	06-07-1984
			OA	6568 A	31-08-1981
			PL	222446 A1	30-01-1981
			PT	70904 A	01-04-1980
			SG	61583 G	15-02-1985
			SU	1195901 A3	30-11-1985
			SU	1052507 A1	07-11-1983
			SU	1225481 A3	15-04-1986
			US	4423071 A	27-12-1983
			YU	61580 A1	30-04-1983
			YU	292382 A1	30-09-1983
			ZA	8001081 A	25-03-1981
<hr/>					
JP 50160358	A	25-12-1975	JP	1148281 C	26-05-1983
			JP	57038616 B	17-08-1982
<hr/>					
US 2010154	A	06-08-1935	NONE		
<hr/>					
EP 447553	A	25-09-1991	JP	1981427 C	25-10-1995

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 447553	A	JP 4007399 A	10-01-1992
		JP 7005914 B	25-01-1995
		JP 2756012 B2	25-05-1998
		JP 3220298 A	27-09-1991
		JP 2608335 B2	07-05-1997
		JP 3121200 A	23-05-1991
		JP 2597725 B2	09-04-1997
		JP 3097798 A	23-04-1991
		DE 69027423 D1	18-07-1996
		DE 69027423 T2	06-02-1997
		EP 0447553 A1	25-09-1991
		HK 44497 A	18-04-1997
		US 5545349 A	13-08-1996
		WO 9103542 A1	21-03-1991
		SG 43007 A1	17-10-1997
US 4134770	A	16-01-1979	
		JP 1046141 C	28-05-1981
		JP 53039116 A	10-04-1978
		JP 55037733 B	30-09-1980
		JP 1047122 C	28-05-1981
		JP 53066960 A	14-06-1978
		JP 55039819 B	14-10-1980

## A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C07C323/52 A61K31/22 A61K31/23

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07C A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DE 20 28 240 A (MITSUBISHI PETROCHEMICAL CO LTD) 23 décembre 1970 (1970-12-23) * page 19, exemple 3; page 20, exemple 4 *	1, 3, 9, 10
X	DATABASE CAPLUS 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; retrieved from STN Database accession no. 1983:18071 XP002203065 * abrégé; RN 83995-03-3 * & JP 57 082573 A (MATSUMO YUSHI-SEIYAKU CO LTD) 24 mai 1982 (1982-05-24)	1, 3, 9, 10
A	L.P. MOLLEYRES ET AL: J. BIOL. CHEM., vol. 263, no. 29, 1988, pages 14832-14838, XP001042275 * page 14835, composés 7-10, 12-16 *	1, 26, 28

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

## \* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après celle date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 janvier 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31/01/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van Amsterdam, L

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 0 018 342 A (OMNIUM FINANCIER AQUITAINE POUR L'HYGIENE ET LA SANTE) 29 octobre 1980 (1980-10-29) * page 4, lignes 14, 28-30; page 5, lignes 6-19; page 16, ligne 29 - page 17, ligne 15; page 34, ligne 34; page 48, lignes 18-19 *	1,22
A	--- K. LARSSON: ACTA CRYSTALLOGR., vol. 16, 1963, pages 741-748, XP000926795 le document en entier	1
A	--- R. LI ET AL: J. ORG. CHEM., vol. 58, no. 7, 1993, pages 1952-1954, XP002203063 * page 1952, schéma 1, composés 7-10 *	1
A	--- CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 51, no. 13, 10 juillet 1957 (1957-07-10) Columbus, Ohio, US; abstract no. 9489f, XP002203064 abrégé & L.C.F. BLACKWELL ET AL: J. CHEM. SOC., 1957, pages 165-169,	1
A	--- DATABASE CAPLUS 'en ligne! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; retrieved from STN Database accession no. 1976:151548 XP002203066 * abrégé; RN 58888-36-1, 58888-37-2 * & JP 50 160358 A (ADEKA ARGUS CHEMICAL CO LTD) 25 décembre 1975 (1975-12-25)	1
A	--- T. NAALSUND ET AL: CHEMISTRY AND PHYSICS OF LIPIDS, vol. 112, no. 1, 2001, pages 59-65, XP000926796 * page 61, composé 6 *	1
A	--- US 2 010 154 A (M.H. HUBACHER) 6 août 1935 (1935-08-06) * page 3, ester I; page 4, ester II; page 5, ester IX *	1
A	--- U. HEIMANN ET AL: LIEBIGS ANN. CHEM., vol. 6, 1980, pages 858-862, XP001042276 * page 858, composés 1-8 *	1
A	--- EP 0 447 553 A (KAO CORP) 25 septembre 1991 (1991-09-25) * page 15, ligne 6 *	1
	---	

-/--

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 4 134 770 A (K. EMOTO ET AL) 16 janvier 1979 (1979-01-16) * colonne 6, exemple 4 * -----	1

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
DE 2028240	A	23-12-1970	JP 49046144 B	07-12-1974
			JP 49046145 B	07-12-1974
			JP 49023295 B	14-06-1974
			DE 2028240 A1	23-12-1970
			GB 1271179 A	19-04-1972
			US 3629194 A	21-12-1971
JP 57082573	A	24-05-1982	JP 1430896 C	24-03-1988
			JP 61053473 B	18-11-1986
EP 18342	A	29-10-1980	AR 224394 A1	30-11-1981
			AT 2509 T	15-03-1983
			AU 534007 B2	22-12-1983
			AU 5587280 A	11-09-1980
			CA 1162928 A1	28-02-1984
			CA 1164012 A2	20-03-1984
			CS 216526 B2	26-11-1982
			CY 1209 A	31-12-1983
			DD 151931 A5	11-11-1981
			DD 158773 A5	02-02-1983
			DE 3061960 D1	24-03-1983
			DK 93880 A	07-09-1980
			EP 0018342 A1	29-10-1980
			ES 8103015 A1	16-05-1981
			FI 800683 A ,B,	07-09-1980
			GR 70703 A1	04-01-1983
			HK 22384 A	23-03-1984
			HU 188840 B	28-05-1986
			HU 183072 B	28-04-1984
			IE 49539 B1	30-10-1985
			IL 59407 A	30-12-1983
			IN 152492 A1	28-01-1984
			JP 1470380 C	14-12-1988
			JP 55141436 A	05-11-1980
			JP 63015256 B	04-04-1988
			KE 3476 A	16-11-1984
			MX 6824 E	08-08-1986
			MY 7585 A	31-12-1985
			NO 800626 A ,B,	08-09-1980
			NZ 192944 A	06-07-1984
			OA 6568 A	31-08-1981
			PL 222446 A1	30-01-1981
			PT 70904 A	01-04-1980
			SG 61583 G	15-02-1985
			SU 1195901 A3	30-11-1985
			SU 1052507 A1	07-11-1983
			SU 1225481 A3	15-04-1986
			US 4423071 A	27-12-1983
			YU 61580 A1	30-04-1983
			YU 292382 A1	30-09-1983
			ZA 8001081 A	25-03-1981
JP 50160358	A	25-12-1975	JP 1148281 C	26-05-1983
			JP 57038616 B	17-08-1982
US 2010154	A	06-08-1935	AUCUN	
EP 447553	A	25-09-1991	JP 1981427 C	25-10-1995

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP 447553	A		JP	4007399 A	10-01-1992
			JP	7005914 B	25-01-1995
			JP	2756012 B2	25-05-1998
			JP	3220298 A	27-09-1991
			JP	2608335 B2	07-05-1997
			JP	3121200 A	23-05-1991
			JP	2597725 B2	09-04-1997
			JP	3097798 A	23-04-1991
			DE	69027423 D1	18-07-1996
			DE	69027423 T2	06-02-1997
			EP	0447553 A1	25-09-1991
			HK	44497 A	18-04-1997
			US	5545349 A	13-08-1996
			WO	9103542 A1	21-03-1991
			SG	43007 A1	17-10-1997
US 4134770	A	16-01-1979	JP	1046141 C	28-05-1981
			JP	53039116 A	10-04-1978
			JP	55037733 B	30-09-1980
			JP	1047122 C	28-05-1981
			JP	53066960 A	14-06-1978
			JP	55039819 B	14-10-1980